



UFGD

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

LAIS GONÇALVES ORTOLANI

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA
POLIMERASE PARA DIAGNÓSTICO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO.**

**STANDARDIZATION TECHNIQUE OF POLYMERASE CHAIN REACTION
FOR DIAGNOSIS OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS.**

**Dourados – MS
2013**

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais – FCBA
Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD
Rod. Dourados/Itahum, Km 12
Caixa Postal 364
CEP.: 79.804-970 --- Tel.: (67) 3410-2221



UFGD

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

LAIS GONÇALVES ORTOLANI¹

¹e-mail: la_ortolani@hotmail.com

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA
POLIMERASE PARA DIAGNÓSTICO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO.**

**STANDARDIZATION TECHNIQUE OF POLYMERASE CHAIN REACTION
FOR DIAGNOSIS OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS.**

Trabalho de conclusão de curso de
graduação apresentado no curso de Ciências
Biológicas, na Universidade Federal da
Grande Dourados - UFGD.

Orientador: Prof. Fábio Juliano Negrão

**Dourados – MS
2013**

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais – FCBA
Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD
Rod. Dourados/Itahum, Km 12
Caixa Postal 364
CEP.: 79.804-970 --- Tel.: (67) 3410-2221

RESUMO: A infecção genital pelo papilomavírus humano (Human Papillomavirus – HPV) é a mais frequente doença sexualmente transmissível (DST) na mulher e no homem. Existem mais de 200 tipos diferentes identificados de HPV, entre os quais mais de 100 estão completamente sequenciados geneticamente e mais de 120 com sequenciamento parcial. Os HPVs são classificados de acordo com a capacidade de alteração na regulação celular, sendo divididos em grupos de baixo, intermediário e alto risco. Os métodos usados na detecção do DNA do HPV em lesões variam amplamente na sua sensibilidade e especificidade. Objetivos: Este trabalho teve por objetivo padronizar a técnica de reação em cadeia da polimerase - PCR, no laboratório de biologia molecular pertencente à Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados para o diagnóstico das papilomatoses humanas. Metodologia: A partir de amostras de mucosa oriundas do banco de amostras do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Saúde teve início os processos de extração e detecção do vírus pela técnica de reação em cadeia da polimerase. Para a extração do DNA foram testados três protocolos distintos, seguindo os protocolos indicados para DNAzolTM, TRIzolTM e extração MiniPrep. Elegeram-se a técnica de PCR com os primers MY09/MY1 e GH20/GH21. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3% e os fragmentos foram visualizados sob luz ultravioleta (UV) no transluminador. Resultados: Das quatro amostras analisadas, todas amplificaram o gene controle da β -globina humana. Assim, a análise da presença do DNA do HPV foi efetuada em todas as amostras, que foram submetidas à técnica de PCR e se mostraram positivas.

PALAVAS-CHAVE: Papilomatoses Humanas, Reação em cadeia da polimerase, padronização.

ABSTRACT

The genital infection by the human papillomavirus (Human Papillomavirus-HPV) is the most common sexually transmitted disease (STD) in women and in men. There are more than 200 different types of HPV identified, among whom more than 100 are completely genetically sequenced and more than 120 with partial sequencing. The Hpv are classified according to the ability to change in cellular regulation, being divided into groups of low, intermediate and high risk. The methods used in the detection of HPV DNA in injuries vary widely in their sensitivity and specificity. Objectives: This study aimed to standardize the technique polymerase chain reaction-PCR, in the laboratory of molecular biology in the Faculdade de Ciências da Saúde of the Universidade Federal da Grande Dourados for diagnosis of Papillomatosis. Methodology: from mucous samples from the samples of Applied Microbiology Laboratory of the Faculdade de Ciências da Saúde began the detection and extraction processes processes of extraction and detection of viruses by polymerase chain reaction. For the extraction of DNA were tested three different protocols, following popular protocols for DNAzolTM, TRIzolTM and extraction MiniPrep. Was elected the technique the PCR with the primers, MY09/MY11and GH20/GH21. The PCR products were subjected to electrophoresis in 3% agarose gel and fragments were visualized under ultraviolet light (UV) in transluminator. Results: of the four samples analyzed, all amplified the gene control of human β -globin. Thus, the analysis of the presence of HPV DNA was made on all samples, who underwent PCR and were positive.

KEYWORDS: Human Papillomatosis, polymerase chain reaction, standardization.

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
PARA DIAGNÓSTICO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO.
STANDARDIZATION TECHNIQUE OF POLYMERASE CHAIN REACTION FOR
DIAGNOSIS OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS.

1. INTRODUÇÃO

Os papilomas vírus possuem genoma de DNA fita dupla, são espécie- específico e possuem uma gama restrita de hospedeiros. Infectam as células do epitélio basal (pele e mucosas) e possuem predileção por local-específico dentro do epitélio susceptível. Alguns tipos causam apenas verrugas cutâneas em humanos e outros causam lesões oncogênicas, especificamente na região anogenital (1).

A prevalência da infecção pelo papilomavírus humano (HPV) em mulheres de 15 anos a 74 anos varia de 1,4% a 25,6%, no Brasil, dependendo da região estudada, sendo considerada a infecção de transmissão sexual mais frequente do mundo (2).

Existem mais de 200 tipos diferentes identificados de HPV, entre os quais mais de 100 estão completamente sequenciados geneticamente e mais de 120 com sequenciamento parcial (3).

São determinantes da infecção pelo HPV fatores próprios do hospedeiro, e aspectos relacionados à própria infecção viral, tais como tipo, carga viral e infecção única ou múltipla. Os fatores de risco, tais como o uso prolongado de contraceptivos orais; fatores ligados à imunidade, à genética, ao comportamento sexual, a idade e tabagismo podem influenciar e determinar a regressão ou a persistência da infecção e também a progressão para lesões precursoras ou câncer (4).

Os HPVs são classificados de acordo com a capacidade de alteração na regulação celular, sendo divididos em grupos de baixo, intermediário e alto risco

26 oncogênico. Esta divisão está baseada em grandes estudos epidemiológicos tipo caso-
27 controle (5,7,9,13). A classificação taxonômica, baseada em dados parciais de
28 sequências da região L1(proteína do capsídio maior do vírus que representa 80% da
29 proteína total viral) dos papilomavírus, também reflete esta divisão, embora haja
30 divergências entre a filogenia estabelecida por sequenciamento e aquela estabelecida
31 por similaridade fenotípica/clínica (3). Os HPV-s de baixo risco oncogênico estão
32 agrupados nas espécies $\alpha 1$, $\alpha 8$ e $\alpha 10$, enquanto os de alto risco se concentram nas
33 espécies $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$ e $\alpha 9$ (6). Em relação à classificação epidemiológica, os HPVs 16,
34 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 82, 26, 53, 66 e 73 são considerados como
35 de alto e intermediário risco oncogênico e os HPVs 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81,
36 70, CP6108 como de baixo risco (5).

37 Os HPV de baixo risco oncogênico, principalmente o 6 e 11, causam as lesões
38 não oncogênicas , limitadas na região anogenital (verrugas, lesão intraepitelial
39 escamosa de baixo grau) e na laríngea (papilomatose laringeal recorrente), com
40 substancial morbidade e alto custo de tratamento (7).

41 A detecção e tratamento precoce de lesões pré-malignas causadas por HPV
42 podem prevenir a progressão ao câncer (8,9).

43 O teste do Papanicolau (teste Pap) é um exame de triagem primário, barato e
44 rápido, porém, possui algumas limitações na detecção de lesões precursoras do câncer
45 cervical, apresentando uma taxa de 20-30% de resultados falso-negativos (6). A PCR é
46 uma técnica baseada na amplificação enzimática de segmentos específicos de DNA do
47 HPV, através de oligonucleotídeos iniciadores específicos (primers) e polimerização
48 com enzimas (DNA – polimerase) (10).

49 A detecção do HPV pela PCR é geralmente realizada utilizando um dos
50 iniciadores consensus, o MY09-MY(11,12) ou o GP5/GP6 (14,10). Atualmente, a PCR

51 permite uma avaliação aprofundada dos dados epidemiológicos, incluindo a prevalência
52 de infecções subclínicas ou latentes. Entretanto, ela tem as seguintes desvantagens:
53 amplificação de quantidades minúsculas de DNA de HPV contaminantes, que podem
54 levar a resultados falsos positivos. Cada método é limitado pela sensibilidade, pela
55 especificidade, pela prática, pelo custo e pela disponibilidade comercial (13).

56 A técnica de PCR é a mais utilizada no diagnóstico molecular de HPV e é
57 considerada o método mais sensível para a detecção do DNA viral em espécimes
58 clínicos (14,15,16).

59 Em comparação ao método de captura híbrida, estudos demonstram uma
60 especificidade que varia de 78,3 a 93% para captura híbrida e 92.8 a 100% para a PCR
61 (17,18). A PCR permite a replicação in vitro do DNA viral para que sejam geradas
62 cópias suficientes para detecção e análise (19, 20, 21).

63 O nível de sensibilidade de uma técnica é definido pela sua capacidade de
64 detecção da menor quantidade possível de DNA. A especificidade determina o nível de
65 acurácia de um ensaio, ou seja, quanto menor a quantidade de falsos-positivos e falsos-
66 negativos da técnica, melhor sua acurácia (22).

67 A reação em cadeia de polimerase (PCR) aumentou a acurácia diagnóstica, mas
68 as técnicas ainda não seguem um padrão comum e os resultados variam entre os
69 laboratórios. Por isso é de grande importância a padronização da técnica local e
70 adequação da metodologia de acordo com as variáveis específicas, para assim melhorar
71 a especificidade e a eficiência da reação; este trabalho teve por objetivo padronizar a
72 técnica de reação em cadeia da polimerase - PCR, no laboratório de biologia molecular
73 pertencente à Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande
74 Dourados para o diagnóstico do HPV.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Padronizar a técnica de reação em cadeia da polimerase - PCR, no Laboratório de Biologia Molecular pertencente à Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados para o diagnóstico de Papilomatoses Humanas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar os métodos de extração para a amplificação do DNA genômico pela técnica da PCR;

- Padronizar a PCR para a detecção do HPV;

- Avaliar a sensibilidade e especificidade da técnica padronizada para diagnóstico das Papilomatoses Humanas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

A partir de amostras de mucosa genital oriundas do banco de amostras do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Saúde, teve início os processos de extração e detecção do vírus pela técnica de reação em cadeia da polimerase. As amostras ficaram armazenadas a - 80 °C até o processamento. Este é um estudo com ensaios experimentais onde as amostras foram escolhidas ao acaso.

3.2 Extração

Para a extração do DNA foram testados três protocolos distintos, seguindo os protocolos indicados para DNAzol TM, TRIzol TM e extração MiniPrep . Feita a extração pelos métodos descritos acima, o material foi submetido à reação em cadeia da polimerase.

3.3 Reação em Cadeia pela Polimerase

Elegeram-se a técnica de PCR com os primers MY09/MY1, descritos por Manos et al. (1989), e GH20/GH21, descritos por Bell et al (1993), que apresentam características de alta sensibilidade e especificidade. Os primers escolhidos foram utilizados, um para detecção do HPV e um como controle interno da reação (controle de qualidade da amostra) para amplificação do gene da β -globina: MY09/MY11, GH20/PCO₄ respectivamente. O primeiro par flanqueia a região L1 do genoma viral. O par de primers MY09/11 flanqueia uma sequência de cerca de 450pb dentro da região de leitura aberta (open reading frame – ORF) L1 do HPV, enquanto o par GH20/PCO₄, uma sequência de cerca de 268pb.

A amplificação foi realizada em um termociclador onde todas as amplificações incluem um controle positivo e um controle negativo. Como controle positivo da reação, foram utilizadas amostras conhecidamente positivas e, como controle negativo, foi utilizado água (23).

A reação foi realizada sob as seguintes condições de concentração para PCR: Água ultrapura; tampão de PCR 10X; $MgCl_2$ 50 mM; dNTP 10mM; Taq polimerase 5U/ μ L e oligonucleotídeos iniciadores a 25 μ M. Em fluxo laminar, foram adicionados 1,5 μ L de DNA genômico de cada amostra. A amplificação foi executada em 20 μ L de uma mistura de reação (MIX). As amostras foram adicionadas ao MIX e submetidas a 40 ciclos de amplificação, onde foram inicialmente testadas três temperaturas de anelamento distintas (69,2; 71 e 73 °C). Os fragmentos foram amplificados sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 05 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 44 segundos e extensão a 72°C por 40 segundos, com extensão final a 72°C por 5 minutos.

3.4 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3% durante uma hora, sob voltagem constante de 80 volts. Os géis foram revelados com brometo de etídio (4,62 ng/mL) e GelRedTM 10,000X , para posterior comparação em relação a qualidade da imagem gerada. Os fragmentos foram visualizados sob luz ultravioleta (UV) no transluminador (Loccus Biotecnologia) e as bandas observadas no gel foram analisadas através de comparação com o padrão de peso molecular escolhido.

4. RESULTADOS

Das quatro amostras analisadas, todas amplificaram o gene controle da β -globina humana (Figura 1). Assim, a análise da presença do DNA do HPV foi efetuada em todas as amostras que foram submetidas à técnica de PCR. A análise das imagens da PCR evidenciou o DNA do HPV em todas as quatro amostras (Figura 2).

Dentre os três tipos de extração utilizados as metodologias de extração por DNAzolTM e MiniPrep foram as mais eficientes. A extração por TRIzolTM não se apresentou eficiente diante dos testes por apresentar um DNA impuro, com altas quantidades de proteína.

Em relação à coloração o corante GelRedTM 10,000X foi mais eficiente pois permitiu a visualização das sequencias reveladas com maior nitides.

A padronização da PCR requer processamento criterioso das amostras para evitar intercorrências causadas por alteração nas variáveis como o número de ciclos, a temperatura, tempo de duração de cada ciclo, a quantidade de magnésio, bem como a qualidade e a quantidade de *primers* utilizados que podem interferir nos resultados do teste. Após a amplificação, observou-se a presença da banda de 450 pares de base na definição dos positivos nas amostras (Figura 3).

5. DISCUSSÃO

A reação em cadeia por polimerase (PCR) é capaz de detectar a presença de DNA viral nas amostras de esfregaço cervical.

Existem diversos protocolos para a PCR, mas os mais utilizados são aqueles onde ocorre amplificação de regiões conservadas do genoma viral, como o gene L1 ou o gene E1, para a detecção de vários tipos de HPV genitais relevantes em uma única reação, através do uso de diferentes tipos de primers degenerados (24).

Como já descrito por Villa (2002), a padronização e utilização dos testes de PCR cada vez mais eficazes ajudariam na identificação de tipos de HPV e na busca do tratamento mais adequado a ser adotado pelo médico a fim de prevenir efetivamente o câncer cervical, principalmente nas pacientes infectadas por HPV de maior potencial oncogênico (25).

A incidência global de infecção por HPV em tumores epiteliais escamosos pode variar entre estudos. Esta variação depende de vários fatores, como características geográficas da população, preparação da amostra e utilização de diferentes métodos de detecção molecular do vírus, daí a importância de se realizar uma padronização local, para servir de protocolo padrão para estudos futuros. A sensibilidade e a especificidade entre os testes para detecção de HPV variam muito.

A padronização realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde, pertencente à Universidade Federal da Grande Dourados teve como padrões de protocolo os seguintes itens: Extração realizada por DNAzolTM; concentração de magnésio para a reação de 50mM com volume de 0,4μL, temperatura de anelamento de 72°C e o reagente de coloração GelRedTM 10,000X.

À medida que a tecnologia avança, as técnicas moleculares vão se aprimorando na detecção do HPV. O objetivo final é desenvolver uma metodologia de baixo custo que apresente resultados rápidos e eficientes.

6. AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Dr. Fábio Juliano Negrão pela oportunidade de realizar este trabalho e pelo tempo dedicado à orientação.

Agradeço as Professoras que colaboraram para a realização deste trabalho, Prof^a. Dr^a. Kelly Cristina da Silva Brabes e Simone Simionatto e as colegas de trabalho Lujan Nunes Sanabria Aliatti, Chaiane Regina Rech, Kesia Esther da Silva e Quésia Moura da Silva.

Agradeço a Prof^a. Me. Alessandra Aparecida Vieira Machado pelo apoio e por participar da banca.

Agradeço também a Deus, aos meus familiares e amigos que me apoiaram.

247	7. ANEXOS
248	7.1 Anexo1 - Figuras
249	7.2 Anexo 2 - Normas da revista
250	

251

252 8. REFERÊNCIAS

253 1. Bravo IG, de Sanjose S, Gottschling M. The clinical importance of understanding the
254 evolution of papillomaviruses. *Trends Microbiol.* 2010 Oct;18(10):432-8.

255 2. de Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, Clifford G, Bruni L, Munoz N, et al.
256 Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus
257 DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007
258 Jul;7(7):453-9

259 3. Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the
260 etiology of human cancer. *Vaccine.* 2006 Aug 31;24 Suppl 3:S3/1-10. 4. de Villiers
261 EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of
262 papillomaviruses. *Virology.* 2004 Jun 20;324(1):17-27.

263 4. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2012:
264 Incidência de câncer de colon e reto. 2012. [cited 2012 Apr 10]. Available from:
265 <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=5>

266 5. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al.
267 Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical
268 cancer. *N Engl J Med.* 2003 Feb 6;348(6):518-27.

269 6. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of
270 papillomaviruses. *Virology.* 2004 Jun 20;324(1):17-27.

271 7. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection.
272 *Vaccine.* 2006 Mar 30;24 Suppl 1:S1-15.

- 273 8. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. Clin Microbiol Rev. 2003
274 Jan;16(1):1-17.
- 275 9. Zanoliti KM, Belinson J. Update on the diagnosis and treatment of human
276 papillomavirus infection. Cleve Clin J Med. 2002 Dec;69(12):948, 51-5, 56 passim.
- 277 10. Ivna MM, Natalia M, Larissa AA, Ledy HSO, Silvia MBC. Comparison of two
278 pairs of primers used in polymerase chain reaction for the detection of Human
279 papillomaviruses in cervical smears. DST – J bras Doenças Sex Transm 2008; 20(2):
280 93-98 – ISSN: 0103-4065.
- 281 11. de Villiers EM. Human pathogenic papillomavirus types: an update. Curr Top
282 Microbiol Immunol. 1994;186:1-12.
- 283 12. Miller CS, White DK. Human papillomavirus expression in oral mucosa,
284 premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the
285 literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1996 Jul;82(1):57-68.
- 286 13. Castro TPPG, Bussoloti FI. Prevalência do papilomavírus humano (HPV) na
287 cavidade oral e na orofaringe. Rev. Bras. Otorrinolaringol. [serial on the Internet]. 2006
288 Apr [cited 2013 Apr 06] ; 72(2): 272-282.
- 289 14. Zaravinos A, Mammas IN, Sourvinos G, Spandidos DA. Molecular detection
290 methods of human papillomavirus (HPV). Int J Biol Markers. 2009;24(4):215-22.
- 291 15. Giuliano AR, Lazcano-Ponce E, Villa LL, Flores R, Salmeron J, Lee JH, et al. The
292 human papillomavirus infection in men study: human papillomavirus prevalence and
293 type distribution among men residing in Brazil, Mexico, and the United States. Cancer
294 Epidemiol Biomarkers Prev. 2008;17(8):2036-43.

295 16. Scheiner MA, Campos MM, Ornellas AA, Chin EW, Ornellas MH, Andrada-Serpa
 296 MJ. Human papillomavirus and penile cancers in Rio de Janeiro, Brazil: HPV typing
 297 and clinical features. *Int Braz J Urol.* 2008;34(4):467-74; discussion 475-6.

298 17. Davis-Devine S, Day SJ, Freund GG. Test performance comparison of inform HPV
 299 and hybrid capture 2 high-risk HPV DNA tests using the SurePath liquid-based Pap test
 300 as the collection method. *Am J Clin Pathol.* 2005;124(1):24-30.

301 18. Weynand B, Delvenne P, Polet R, Guiot Y, Arafa M, Somja J, et al. Validation of
 302 ThermoFisher's Papspin for human papillomavirus detection in cervicovaginal
 303 specimens using PCR with GP5+/GP6+ primers and the Hybrid Capture II assay. *Clin*
 304 *Microbiol Infect.* 2010;16(6):671-5.

305 19. Davies P, Kornegay J, Iftner T. Current methods of testing for human
 306 papillomavirus. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2001;15(5):677-700.

307 20. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, et al.
 308 Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.*
 309 2000;38(1):357-61.

310 21. Brahmasandra SN, Burke DT, Mastrangelo CH, Burns MA. Mobility, diffusion and
 311 dispersion of single-stranded DNA in sequencing gels. *Electrophoresis.*
 312 2001;22(6):1046-62.

313 22. Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med.*
 314 2003;127(8):940-5.

315 23. Burchell NA, Winer RL, Sanjosé S, Franco EL. Chapter 6: Epidemiology and
 316 transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine.* 2006;24(S3):52-61.

24. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiology Reviews* 2003; 16(1): 1-17.

25. Vidal FCB, Nascimento MDSB, Ferraro CTL, Brito LMO. Molecular methods for human papillomavirus detection: literature review. *FEMINA* | Setembro/Outubro 2012 | vol 40 | nº 5

26. BELL, D. A. et al. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*, v. 85, n. 14, p. 1159-64, 1993.

27. MANOS, M.M. et al. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells*, New York, v. 7, p. 209-214, 1989.

7.1 ANEXO 1

Figura 1

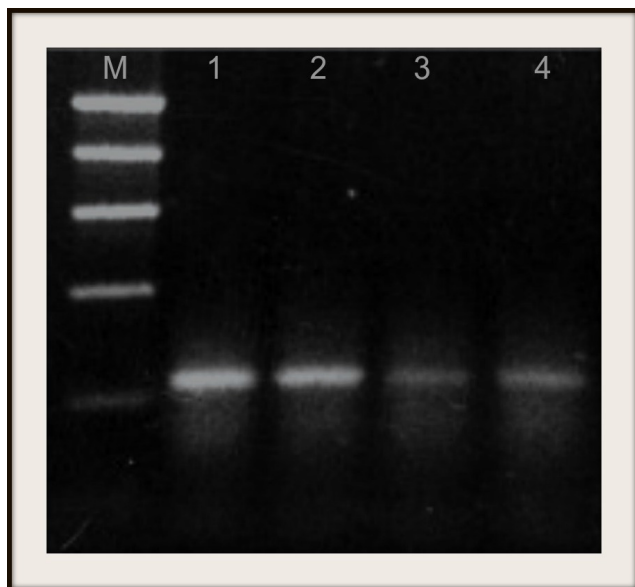


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose a 3% mostrando resultado da amplificação da β -globina (268 pb) por PCR, com o uso dos primes GH20/PCO₄. PM 100 = padrão de tamanho molecular (100 pb DNA Ladder, Invitrogen).

Figura 2

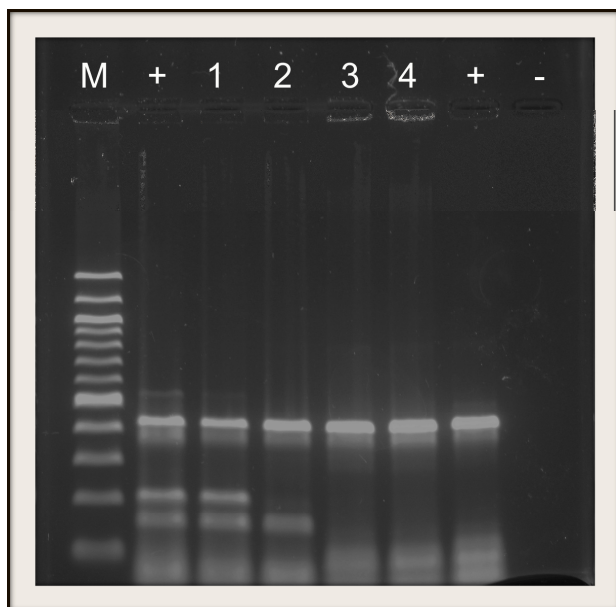


Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose a 3% mostrando resultado da amplificação do HPV (450 pb) por PCR, com o uso dos primes MY09/MY11. PM 100 = padrão de tamanho molecular (100 pb DNA Ladder, Invitrogen); controle positivo para DNA do HPV; controle negativo.

Figura 3

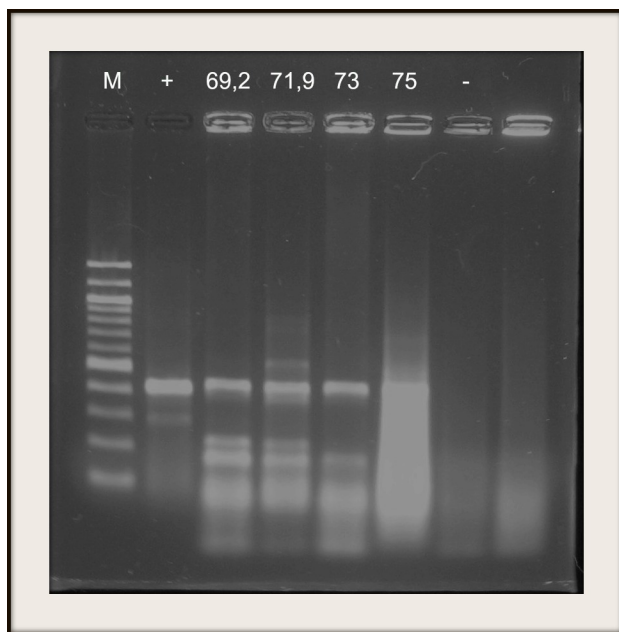


Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose a 3% mostrando resultado da amplificação do HPV (450 pb) por PCR, teste da temperatura de Melting. PM 100 = padrão de tamanho molecular (100 pb DNA Ladder, Invitrogen); controle positivo para DNA do HPV; controle negativo.

7.2 ANEXO 2

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

A Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia (Rev Bras Ginecol Obstet., ISSN 0100 7203), publicação mensal de divulgação científica da Federação das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia (Febrasgo), é dirigida a obstetras, ginecologistas e profissionais de áreas afins, com o propósito de publicar contribuições originais sobre temas relevantes no campo da Ginecologia, Obstetrícia e áreas correlatas. É aberta a contribuições nacionais e internacionais. A revista aceita e publica trabalhos em português, inglês e espanhol.

O material enviado para análise não pode ter sido submetido simultaneamente à publicação em outras revistas nem publicado anteriormente. Na seleção dos manuscritos para publicação, são avaliadas originalidade, relevância do tema e qualidade da metodologia utilizada, além da adequação às normas editoriais adotadas pela revista. O material publicado passa a ser propriedade da Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia e da Febrasgo, só podendo ser reproduzido, total ou parcialmente, com a anuência dessas entidades.

Os manuscritos submetidos à revista são analisados por pareceristas e o sigilo sobre a autoria e a identidade dos revisores é garantido durante todo o processo de edição. Os pareceres dos revisores e as instruções do editor serão enviados para os autores para que eles tomem conhecimento das alterações a serem introduzidas. Os autores devem reenviar o texto com as modificações solicitadas assim que possível, devendo justificar, na carta de encaminhamento, se for o caso, o motivo do não atendimento de alguma sugestão para modificação. Não havendo retorno do trabalho após três meses, presume-

se que os autores não têm mais interesse na publicação. Os autores podem solicitar em qualquer ponto do processo de análise e edição do texto a sustação do processo e a retirada do trabalho. Os conceitos e as declarações contidos nos artigos são de responsabilidade dos autores.

A revista publica contribuições nas seguintes categorias:

1. Artigos Originais, trabalhos completos prospectivos, experimentais ou retrospectivos. Manuscritos contendo resultados de pesquisa clínica ou experimental original têm prioridade para publicação.
2. Relatos de Casos, de grande interesse e bem documentados, do ponto de vista clínico e laboratorial. Os autores deverão indicar na carta de encaminhamento os aspectos novos ou inesperados em relação aos casos já publicados. O texto das seções Introdução e Discussão deve ser baseado em revisão bibliográfica atualizada. O número de referências pode ser igual ao dos trabalhos completos.
3. Técnicas e Equipamentos, para apresentação de inovações em diagnóstico, técnicas cirúrgicas e tratamentos, desde que não sejam, clara ou veladamente, propaganda de drogas ou outros produtos. Valem para essa categoria todas as normas aplicadas para trabalhos completos.
4. Artigos de Revisão, incluindo avaliação crítica e sistematizada da literatura, meta-análises ou revisões sistemáticas. A seleção dos temas e o convite aos autores têm como base planejamento estabelecido pela editoria. Contribuições espontâneas podem ser aceitas. Nesse caso, devem ser enviados inicialmente um resumo ou roteiro do texto, a lista de autores e as respectivas publicações sobre o tema. Se houver interesse da revista, será enviado convite para apresentação do texto definitivo. Todos os autores devem ter publicações em periódicos regulares, indexados sobre o tema da revisão. O

número de autores é limitado a quatro, dependendo do tipo de texto e da metodologia empregada. Devem ser descritos os métodos e procedimentos adotados para a obtenção do texto, que deve ter como base referências recentes, inclusive do ano em curso. Tratando-se de tema ainda sujeito a controvérsias, a revisão deve discutir as tendências e as linhas de investigação em curso. Apresentar, além do texto da revisão, resumo, abstract e conclusões. Ver a seção "Preparo do manuscrito" para informações quanto ao texto principal, página de rosto, resumo e abstract;

5. Comentários Editoriais, solicitados pelo editor;
6. Resumos de Teses apresentadas e aprovadas nos últimos 12 meses, contados da data de envio do resumo. Devem conter, aproximadamente, 300 palavras e, para serem aceitos, devem seguir as normas da revista quanto à estruturação, à forma e ao conteúdo. Incluir título em português e inglês e, no mínimo, três palavras ou expressões-chave. Não há revisão do texto dos Resumos de Teses. No arquivo enviado, informar: nome completo do autor e do orientador; membros da banca; data de apresentação e a identificação do serviço ou departamento onde a tese foi desenvolvida e apresentada. Lembramos que a publicação do resumo não impede a posterior publicação do trabalho completo em qualquer periódico.
7. Cartas dos Leitores para o Editor, versando sobre matéria editorial ou não, mas com apresentação de informações relevantes ao leitor. As cartas podem ser resumidas pela editoria, mas com manutenção dos pontos principais. No caso de críticas a trabalhos publicados, a carta é enviada aos autores para que sua resposta possa ser publicada simultaneamente.

Informações gerais

1. A revista não aceita material editorial com objetivos comerciais.

2. Conflito de interesses: devem ser mencionadas as situações que podem influenciar de forma inadequada o desenvolvimento ou as conclusões do trabalho. Entre essas situações, menciona-se a participação societária nas empresas produtoras das drogas ou dos equipamentos citados ou utilizados no trabalho, assim como em concorrentes da mesma. São também consideradas fontes de conflito os auxílios recebidos, as relações de subordinação no trabalho, as consultorias etc.
3. No texto, deve ser mencionada a submissão e a aprovação do estudo por um Comitê de Ética em Pesquisa reconhecido pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).
4. Artigo que trate de pesquisa clínica com seres humanos deve incluir a declaração, na seção Métodos, de que os sujeitos do estudo assinaram o termo de consentimento livre e informado. Os autores devem informar, também, que a pesquisa foi conduzida de acordo com a Declaração de Helsinque revisada em 2008.
5. No caso de trabalhos envolvendo experimentação animal, os autores devem indicar na seção Métodos que foram seguidas as normas contidas no CIOMS (Council for International Organization of Medical Sciences) Ethical Code for Animal Experimentation (WHO Chronicle 1985; 39(2):51-6) e os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA (www.cobea.org.br).
6. Todos os ensaios controlados aleatórios (randomized controlled trials) e clínicos (clinical trials) submetidos à publicação devem ter o registro em uma base de dados de ensaios clínicos. Essa é uma orientação da Plataforma Internacional para Registros de Ensaios Clínicos (ICTRP) da Organização Mundial da Saúde (OMS), e do International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). As instruções para o registro estão disponíveis no endereço eletrônico do ICMJE (http://www.icmje.org/clin_trialup.htm) e

o registro pode ser feito na base de dados de ensaios clínicos da National Library of Medicine, disponível em <http://clinicaltrials.gov/ct/gui>.

7. O número de autores de trabalhos completos e relatos de casos é limitado a sete. Trabalhos de autoria coletiva (institucionais) devem ter os responsáveis especificados. Trabalhos e estudos multicêntricos podem ter número de autores compatível com o número de centros (cada situação será avaliada pela editoria e pelos revisores). Os investigadores responsáveis pelos protocolos aplicados devem ser especificados. Todos os autores devem ter conhecimento do texto enviado para a revista.

8. O conceito de coautoria é baseado na contribuição de cada um, para a concepção e planejamento do trabalho, análise e interpretação dos dados, para a redação ou revisão crítica do texto. A inclusão de nomes cuja contribuição não se enquadre nos critérios citados ou que tenham fornecido apenas suporte material não é justificável.

9. Os autores serão informados, por correspondência eletrônica, do recebimento dos trabalhos. Os trabalhos que estiverem de acordo com as Instruções aos Autores e se enquadram na política editorial da revista serão enviados para análise por revisores indicados pelo editor. Os originais em desacordo com os objetivos da revista ou com essas instruções são devolvidos aos autores para as adaptações necessárias antes da avaliação pelo Conselho Editorial ou recusados sem análise por revisores.

10. Junto dos arquivos originais, deve ser enviada uma carta de encaminhamento, na qual deve ficar explícita a concordância com as normas editoriais, com o processo de revisão e com a transferência de copyright para a revista.

11. Para manuscritos originais, não ultrapassar 25 páginas de texto digitado ou aproximadamente 30.000 caracteres. Limitar o número de tabelas e figuras ao necessário para apresentação dos resultados que são discutidos (como norma geral,

limitar a cinco). Para manuscritos do tipo Relato de Caso, não ultrapassar 15 páginas de texto ou 18.000 caracteres (ver "Preparo do manuscrito", "Resultados").

12. O trabalho deve ser enviado pelo sistema de submissão online no portal SciELO. O endereço eletrônico de todos os autores deve ser fornecido. Desta forma, os coautores receberão informação sobre a submissão do trabalho e, assim, não será necessária a assinatura de todos na carta de encaminhamento. O endereço eletrônico para correspondência com a revista é rbgo@fmrp.usp.br. O arquivo correspondente ao trabalho deve ser único e deve conter texto, referências, tabelas e figuras.

Preparo dos manuscritos

As normas que seguem foram baseadas no formato proposto pelo ICMJE e publicado no artigo "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals", atualizado em Outubro de 2008 e disponível no endereço eletrônico: <http://www.icmje.org/>.

Apresentação do texto

1. Os trabalhos devem ser digitados em espaço 2 em todas as seções, da página de rosto às referências bibliográficas, tabelas e legendas. Cada página deve conter aproximadamente 25 linhas em uma coluna. Usar preferencialmente o processador de texto Microsoft Word® e a fonte Times New Roman 12. Não dar destaque a trechos do texto: não sublinhar ou usar negrito. Numerar todas as páginas, iniciando pela de rosto.
2. Não usar maiúsculas nos nomes próprios (a não ser a primeira letra) no texto ou nas referências bibliográficas. Não utilizar pontos nas siglas (DPP em vez de D.P.P.). Quando usar siglas ou abreviaturas, descrevê-las por extenso na primeira vez que mencionadas no texto. Iniciar cada seção em uma nova página: página de rosto; resumo

e palavras ou expressões-chave; abstract e keywords; texto; agradecimentos; referências; tabelas individuais e legendas das figuras.

Página de rosto

Apresentar o título do trabalho em português e em inglês; nomes completos dos autores sem abreviaturas; endereços eletrônicos válidos de todos os autores (opcional, em substituição à carta de encaminhamento); nome da instituição onde o trabalho foi desenvolvido; afiliação institucional dos autores; informações sobre auxílios recebidos sob forma de bolsas de estudos, financiamento, fornecimento de drogas, reagentes ou equipamentos. Obrigatoriamente deve ser fornecido o endereço da instituição onde o trabalho foi desenvolvido, o qual é publicado na página inicial do trabalho. Devem ser indicados nome, endereço, telefone/fax e e-mail do autor para o qual a correspondência deve ser enviada. Essas informações pessoais são empregadas apenas para correspondência com a revista e somente são publicadas se houver pedido do(s) autor(es).

Resumo

O resumo do trabalho deve aparecer na segunda página. Para trabalhos completos, redigir um resumo estruturado, que deve ser dividido em seções identificadas: objetivo, métodos, resultados e conclusões. Deve ter aproximadamente 300 palavras. O resumo deve conter as informações relevantes, permitindo que o leitor tenha uma ideia geral do trabalho. Deve incluir descrição resumida de todos os métodos empregados e da análise estatística efetuada. Expor os resultados numéricos mais relevantes, e não apenas indicação de significância estatística. As conclusões devem ser baseadas nos resultados

do trabalho e não da literatura. Evitar o uso de abreviações e símbolos. Não citar referências bibliográficas no resumo.

Abaixo do texto do resumo indicar o número de registro e/ou identificação para os ensaios controlados aleatórios e ensaios clínicos (ver item 5 das "Informações Gerais").

Na mesma página do resumo, citar pelo menos três palavras ou expressões-chave que serão empregadas para compor o índice anual da revista. Devem ser baseadas nos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) publicado pela Bireme, que é uma tradução do Medical Subject Headings (MeSH) da National Library of Medicine e está disponível no endereço eletrônico: <http://decs.bvs.br>.

O abstract deve ser versão fiel do texto do resumo estruturado (purpose, methods, results e conclusions). Deve ser também acompanhado da versão para o inglês das palavras ou expressões-chave (keywords). O resumo e o abstract dos Relatos de Casos e dos Artigos de Revisão e de Atualização não devem ser estruturados e são limitados a 150 palavras.

Introdução

Repetir, na primeira página da introdução, o título completo em português e inglês. Nessa seção, mostre a situação atual dos conhecimentos sobre o tópico em estudo, divergências e lacunas que possam eventualmente justificar o desenvolvimento do trabalho, mas sem revisão extensa da literatura. Para Relatos de Casos, apresentar um resumo dos casos já publicados, epidemiologia da condição relatada e uma justificativa para a apresentação como caso isolado. Expor claramente os objetivos do trabalho.

Métodos

Iniciar essa seção indicando o planejamento do trabalho: se prospectivo ou retrospectivo; ensaio clínico ou experimental; se a distribuição dos casos foi aleatória ou não etc. Descrever os critérios para seleção das pacientes ou Grupo Experimental, inclusive dos Controles. Identificar os equipamentos e reagentes empregados (fabricante, cidade e país). Se a metodologia aplicada já tiver sido empregada, indicar as referências, além da descrição resumida do método. Descrever também os métodos estatísticos empregados e as comparações para as quais cada teste foi empregado. Os trabalhos que apresentam como objetivo a avaliação da eficácia ou a tolerabilidade de tratamentos ou drogas devem, necessariamente, incluir Grupo Controle adequado. Para informações adicionais sobre o desenho de trabalhos desse tipo, consultar ICH Harmonized Tripartite Guideline - Choice of Control Group and Related Issues in Clinical Trials (http://www.hc-sc.gc.ca/hpfb-dgpsa/tpd-dpt/e10_e.html). Ver também itens 4 e 5 das "Informações Gerais".

Resultados

Apresentar os resultados em sequência lógica, no texto, nas tabelas e nas figuras. Expor os resultados relevantes para o objetivo do trabalho e que são discutidos. Não repetir no texto dessa seção todos os dados das tabelas e figuras, mas descrever e enfatizar os mais importantes, sem interpretação dos mesmos (ver também "Tabelas"). Nos Relatos de Casos, as seções "Métodos" e "Resultados" são substituídas pela "Descrição do caso", mantendo-se as demais.

Discussão

Devem ser realçadas as informações novas e originais obtidas na investigação. Não repetir dados e informações já mencionados nas seções "Introdução" e "Resultados".

Evitar citação de tabelas e figuras. Ressaltar a adequação dos métodos empregados na investigação. Comparar e relacionar suas observações com as de outros autores, comentando e explicando as diferenças. Explicar as implicações dos achados, suas limitações e fazer as recomendações decorrentes. Para Relatos de Casos, basear a discussão em ampla e atualizada revisão da literatura. As informações sobre os casos já publicados podem ser tabuladas e exibidas nessa seção para comparações.

Agradecimentos

Dirigidos a pessoas que tenham colaborado intelectualmente, mas cuja contribuição não justifica coautoria, ou para aquelas que tenham provido apoio material.

Referências

Todos os autores e trabalhos citados no texto devem constar dessa seção e vice-versa. Numerar as referências bibliográficas por ordem de entrada no trabalho e usar esses números para as citações no texto. Evitar número excessivo de referências, selecionando as mais relevantes para cada afirmação e dando preferência para os trabalhos mais recentes. Não empregar citações de difícil acesso, como resumos de trabalhos apresentados em congressos, teses ou publicações de circulação restrita (não indexados). Não empregar referências do tipo "observações não publicadas" e "comunicação pessoal". Artigos aceitos para publicação podem ser citados acompanhados da expressão: "aceito e aguardando publicação" ou "in press", indicando-se periódico, volume e ano. Trabalhos aceitos por periódicos que estejam disponíveis online, mas sem indicação de fascículos e páginas, devem ser citados como "ahead of print". Outras publicações dos autores (autocitação) devem ser empregadas apenas se houver necessidade clara e forem relacionadas ao tema. Nesse caso, incluir entre as referências

bibliográficas apenas trabalhos originais publicados em periódicos regulares (não citar capítulos ou revisões).

O número de referências bibliográficas deve ser aproximadamente 35. Os autores são responsáveis pela exatidão dos dados constantes das referências bibliográficas.

Para todas as referências, citar os autores até o sexto. Se houver mais de seis autores, citar os seis primeiros, seguidos da expressão et al., conforme os seguintes modelos:

Tabelas

Apresentar as tabelas em páginas separadas, com espaço duplo e preferencialmente fonte Arial 8. A numeração deve ser sequencial, em algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. Todas as tabelas devem ter título e todas as colunas da tabela devem ser identificadas com um cabeçalho. A legenda deve conter informações que permitam ao leitor entender o conteúdo das tabelas e figuras, mesmo sem a leitura do texto do trabalho. As linhas horizontais devem ser simples e limitadas a duas no topo e uma no final da tabela. Não empregar linhas verticais. Não usar funções de criação de tabelas, comandos de justificação, tabulações decimais ou centralizadas. Utilizar comandos de tabulação (tab) e não o espaçador para separar as colunas e, para nova linha, a tecla enter. No rodapé da tabela, deve constar legenda para abreviaturas e testes estatísticos utilizados.

Figuras (gráficos, fotografias e ilustrações)

As figuras devem ser apresentadas em páginas separadas e numeradas sequencialmente, em algarismos arábicos, conforme a ordem de aparecimento no texto. Todas as figuras devem ter qualidade gráfica adequada e apresentar título e legenda. Para evitar

problemas que comprometam o padrão da revista, o processo de digitalização de imagens (scan) deve obedecer aos seguintes parâmetros: para gráficos ou esquemas, usar 300 dpi/bitmap para traço; para ilustrações e fotos (preto e branco), usar 300 dpi/RGB ou grayscale. Em todos os casos, os arquivos devem ter extensão .tif e/ou .jpg. Também são aceitos arquivos com extensão .xls (Excel), .eps, .psd para ilustrações em curva (gráficos, desenhos e esquemas). São aceitas, no máximo, cinco figuras. Se as figuras já tiverem sido publicadas, devem vir acompanhadas de autorização por escrito do autor/editor e constando a fonte na legenda da ilustração.

Legendas

Digitar as legendas usando espaço duplo, acompanhando as respectivas figuras (gráficos, fotografias e ilustrações). Cada legenda deve ser numerada em algarismos arábicos, correspondendo a cada figura, e na ordem em que foram citadas no trabalho.

Abreviaturas e siglas

Devem ser precedidas do nome completo quando citadas pela primeira vez no texto. Nas legendas das tabelas e figuras, devem ser acompanhadas de seu nome por extenso. As abreviaturas e as siglas não devem ser usadas no título dos artigos e nem no resumo.