

Elisabete Aparecida Campos

**VIABILIDADE DO DNA-HPV EXTRAÍDO E
COLETADO NO MEIO UCM DE MATERIAL
DESNATURADO EM DIFERENTES TEMPOS DE
ESTOCAGEM**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ORIENTADOR: Prof. Dr. José Antonio Simões
CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Sophie F. M. Derchain**

**UNICAMP
2007**

Elisabete Aparecida Campos

**VIABILIDADE DO DNA-HPV EXTRAÍDO E
COLETADO NO MEIO UCM DE MATERIAL
DESNATURADO EM DIFERENTES TEMPOS DE
ESTOCAGEM**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de
Mestre em Tocoginecologia, área de
Ciências Biomédicas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Antonio Simões
CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Sophie F. M. Derchain

UNICAMP
2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C157v Campos, Elisabete Aparecida
Viabilidade do DNA-HPV extraído e coletado no meio UCM de material desnaturado em diferentes tempos de estocagem / Elisabete Aparecida Campos. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientadores : José Antonio Simões, Sophie Françoise Mauricette Derchain

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Papilomavírus humano. 2. Câncer - Diagnóstico. 3. Colo uterino - Cancer. I. Simões, José Antonio. II. Derchain, Sophie Françoise Mauricette. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês : Recovery of DNA for the detection of HPV from clinical cervical specimens stored for up to two years in Universal Collection Medium (UCM) with denaturing reagent

Keywords: • HPV

- Neoplasm, diagnosis
- Uterine Cervical Neoplasms

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Antonio Simões

Prof. Dr. Luiz Carlos Zeferino

Profa. Dra. Renata Gontijo

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: ELISABETE APARECIDA CAMPOS

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ ANTONIO SIMÕES

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. SOPHIE F. M. DERCHAIN

Membros:

1.

2.

3.

Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 31/07/2007

Dedico esta Dissertação.

Aos meus pais, Antônio e Terezinha - meus primeiros professores-, por todo amor, respeito e lições de vida.

À minha irmã Marisa, minha companheira e grande incentivadora nos estudos.

Com saudades do tempo em que pude compartilhar minha vida com a alegria de vocês.

Às minhas irmãs e irmãos, Lázaro, Pedro, Vilma, Aloísio, Cristina, Marcos, Marcelo, Eduardo, Eleida e Renato, por continuarmos unidos.

Aos novos integrantes da família... Cleusa, Adelino, Goreth, Maria, Ester, Paula, Reinaldo, Vilma e Margarida.

Aos novos amores que foram chegando, Alexandre, Sheyla, Rebeca, Samantha, Fábio, Roberto, Gabriel, Lucas, Marisinha, Wendel e Bárbara.

Ao Márcio pela compreensão, carinho, amor e dedicação.

E à minha irmã de coração, Maria de Lourdes de Oliveira (Lurdinha).

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. José Antonio Simões, pela amizade, confiança, dedicação e orientação com que me acompanhou neste processo.

À Profª. Drª. Sophie Françoise Mauricette Derchain, pela amizade, carinho, incentivo, confiança e segurança que transmitiu.

À Profª. Drª. Sílvia Helena Rabelo-Santos, por ter me contagiado com o vírus do “nós podemos e vamos”, pela amizade, carinho e total colaboração.

Ao Prof. Dr. Luís Otávio Zanatta Sariam, pela parceria, amizade e colaboração em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Levi, pelos ensinamentos e parceria.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Zeferino, pelo carinho e apoio.

Ao Prof. Dr. Luis Bahamondes, por sua contribuição.

Ao Prof. Dr. Paulo César Giraldo, por suas observações.

À Dra. Maria Cristina do Amaral Westin, pela amizade e pelo apoio.

À Denise Rocha Pitta Lima de Moraes, pela amizade, paciência, carinho e irmandade em todos esses anos que trabalhamos juntas.

À Priscila Mendes Portugal, amiga, colaboradora e companheira de muitos momentos.

Aos técnicos do laboratório Alex e Alexandre, pela amizade.

Às alunas e companheiras de pós, Eliane, Michelle e Trícia.

Ao Lúcio Gurgel Tito, pela amizade e paciência.

À Margarete Souza Donadon, pelo carinho e cuidados.

Às amigas Sílvia Wenzel e Keila.

A todos os amigos e funcionários que de alguma forma contribuíram para que este estudo pudesse ser realizado.

A todos, meu carinho e muito obrigada.

O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.

Fernando Pessoa

Estrutura da Tese

Esta tese está sendo apresentada no formato alternativo de disponibilização de dissertações de mestrado e teses de doutorado na UNICAMP e de acordo com o disposto em “*Normas, procedimentos e orientações para publicação de dissertações e teses da Faculdade de Ciências Médicas*”(2004).

Inclui uma introdução sobre o tema, os objetivos, materiais e métodos da dissertação, um artigo original submetido à revista: *Journal Virological Methods* com a descrição dos métodos e resultados obtidos. As etapas e experimentos necessários ao desenvolvimento desta Pesquisa foram realizados no

Laboratório Clínico- Especializado – CAISM/UNICAMP

*Este estudo foi financiado pela
Fundação de Amparo à Pesquisa
do Estado de São Paulo- FAPESP-
Processo nº2005/54482-0*

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	xi
Resumo	xii
Summary.....	xiv
1.Introdução	15
2 .Objetivos	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3. Materiais e Métodos.....	24
3.1. Extração do DNA do material desnaturado.....	24
3.2. Quantificação de DNA-HPV em espectrofotômetro.....	24
3.3. Reação em Cadeia da Polimerase para β - Globina.....	25
3.4 - Reação em Cadeia da Polimerase para HPV.....	25
4. Publicação.....	26
5. Conclusões	44
6. Referências Bibliográficas	45
7.Bibliografia de Normatizações	50

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

ASC	<i>Atypical Squamous Cells</i>
Ascus	<i>Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance</i>
HC 2	<i>Hybrid Capture II</i>
DNA	<i>Ácido desoxirribonucléico</i>
HPV	<i>Human papillomavirus</i>
CIN	<i>Cervical Intraepithelial Neoplasia</i>
OD	<i>Optical Density</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RLFP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RLU	<i>Relative Light Units</i>
UCM^R	<i>Universal Collection Medium</i>
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas

Resumo

Objetivo: Avaliar a recuperação e estabilidade do DNA para detecção do papillomavírus humano (HPV) através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando amostras estocadas por até 24 meses em Universal Collection Medium (UCM) com reagente desnaturante. **Métodos:** Sessenta amostras de citologia da cérvix uterina positivas para HPV, - que foram coletadas em UCM com resultado de Papanicolaou NIC 2 e NIC 3 entre os anos de 2003 e 2005 e que foram estocadas - foram utilizadas para este estudo. Todas as amostras haviam sido congeladas a -20°C após a adição do reagente desnaturante (0,05% de azida sódica + solução de NaOH) e da retirada da alíquota necessária para a realização do teste de Captura-Híbrida 2 (CH 2) para identificação do DNA-HPV. O tempo de estocagem das amostras utilizadas foi de 6, 12 e 24 meses (20 amostras para cada tempo de estocagem). A extração do DNA foi realizada de acordo com protocolo específico para este tipo de material. A técnica de PCR foi realizada para confirmação da presença e da integridade do DNA através da detecção da β -globina humana utilizando-se *primers* de consenso G73 e G74, e a detecção do DNA-HPV foi realizada utilizando-se os *primers* de consenso PGMY09 e PGMY11. **Resultados:** O DNA extraído do material desnaturado foi recuperado em 57 das 60 (95%) amostras estudadas. O DNA-HPV só não pôde

ser detectado por PCR em uma destas amostras recuperadas. **Conclusão:** A recuperação e a estabilidade do DNA-HPV foi excelente após dois anos de estocagem do material cervical colhido em UCM com reagente desnaturante.

Summary

Objective: To evaluate the recovery and stability of DNA for the detection of HPV by Polymerase Chain Reaction (PCR) from clinical specimens stored for up to 24 months in Universal Collection Medium (UCM) with denatured reagent. **Materials and methods:** Sixty stores HPV-positive cervical smears collected from women with CIN 2 or CIN 3 diagnosis at Pap smear cytology between 2003 and 2005 were utilized to study. All samples were stored at -20°C after add of the denaturing reagent (sódica azida 0,05% and solution NaOH) and removing the aliquot required for carrying out the hybrid capture 2 assay for the identification of HPV-DNA, the samples were stored for 6, 12 or 24 months (20 samples for each storage time). DNA-HPV extraction was performed according to a protocol specifically designed for this type of material. The presence and quality of DNA was confirmed by human β -globin detection using the consensus primers G73 and G74 and HPV was detected using the consensus primers PGMY09 and PGMY11 through the technique of PCR. **Results:** The DNA extracted from the denatured material was recovered in 57 out of 60 (95%) of the samples studied. DNA-HPV failed to be detected in one of the recovered samples. **Conclusions:** The recovery and stability of DNA-HPV from cervical samples stored for up to two years in UCM were excellent.

1.Introdução

As técnicas de biologia molecular permitiram uma relação causal entre a infecção persistente com alguns tipos de papilomavírus humano (HPV) e o câncer cervical, apoiando as observações prévias que relacionaram esta doença com a atividade sexual (Dell e Gaston, 2001; Levi et al., 2002; 2004).

O câncer cervical é precedido em muitos anos por lesões precursoras, as neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC), que podem ser diagnosticadas por métodos citológicos, colposcópicos e histológicos (Ho et al., 1998; Bosch et al., 2002; Hudelist et al., 2004, Kroeff, 2004). Walboomers et al. (1999) detectaram a prevalência de 99,7% de HPV em casos de carcinoma cervical.

A infecção persistente por HPV de alto risco oncogênico aparece como sendo um dos pré-requisitos para o desenvolvimento da NIC e do carcinoma invasivo (Dubeau et al., 1986; Lorincz et al., 1992; Swan et al., 1999; Villa et al., 2000; Bosch et al., 2002). O teste utilizado em programas de rastreamento é o exame preventivo de Papanicolaou. Todavia, este teste não permite avaliar com precisão absoluta a positividade para HPV ou estabelecer objetivamente as pacientes de maior risco para desenvolver o câncer cervical (Ho et al., 1998).

Nos últimos 20 anos, para tentar elucidar e acompanhar com maior detalhe o papel do HPV nas neoplasias cervicais e câncer invasivo, testes moleculares têm sido utilizados. A captura-híbrida 2 (CH 2) é um método baseado na reação dos híbridos com o conjugado e detecção dos híbridos por quimiluminescência. Reagindo com sonda específica, o material para análise forma híbridos de RNA/DNA que são capturados por anticorpos que revestem as paredes de tubos ou microplaca. Em seguida, os híbridos imobilizados reagem com antianticorpos específicos conjugados à fosfatase alcalina, formando substrato estável que é posteriormente detectado por quimiluminescência ultra-sensível. Este é o único teste aceito pela *Food and Drug Administration (FDA)* dos Estados Unidos para uso diagnóstico em rotina clínica para identificação da presença do HPV. Seu uso para rastreamento da infecção pelo HPV está aprovado nos EUA quando realizado em conjunto com o Papanicolaou em mulheres com 30 anos ou mais. Além disso, naquele país há um aumento de interesse no uso deste teste para triagem de mulheres com diagnóstico de células escamosas atípicas (ASC), anteriormente denominadas de significado indeterminado (ASCUS) (Solomon et al., 2002; Poljak et al., 2002; Hubbard, 2003; Lorincz, 2003). No Brasil ainda não há definições e orientações padronizadas e consensuais neste sentido.

Para o teste de CH 2 são coletadas amostras de células cervicais que são acondicionadas em um dos dois tipos de meios existentes: Specimen Transport Medium (STM) - um meio baseado em água com propriedades amino alifáticas, designado como um preservativo de DNA - e o Universal Collection Medium (UCM) - soluções baseadas em água que compreendem fixadores, como um ou

mais álcoois, e que pode também ser utilizado na citologia. O primeiro passo para a realização do teste de CH 2 é a adição de 500µl de reagente desnaturante. Após, as amostras processadas são hibridizadas em condições de alta estringência com dois tipos de sondas, uma chamada *sonda A* que detecta os tipos de HPV considerados de baixo risco oncogênico (6, 11, 42, 43, 44), e *sonda B*, que detecta os considerados de alto risco oncogênico (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, e 68).

Como a CH 2 apenas divide os tipos de HPV em baixo e alto risco oncogênico, isso lhe confere algumas restrições, pois o teste ideal deveria detectar múltiplos tipos de HPV, identificar tipos individuais e dar a informação sobre a carga viral de cada tipo encontrado (Ho et al., 1998; Hudelist et al., 2004). Deveria ainda ser de fácil realização, de alta reprodutibilidade, com alta especificidade e sensibilidade, além de ser disponível para realização em larga escala através de análises automatizadas (Iftner et al., 2003).

A reação em cadeia da polimerase (PCR), técnica de amplificação gênica altamente sensível e específica, possibilitou que os estudos epidemiológicos mais recentes confirmassem este vírus como determinante intermediário na sequência de eventos que levam ao desenvolvimento de carcinoma do colo uterino. Os métodos baseados em PCR têm maior sensibilidade de detecção dos genomas virais e, acoplados a um ensaio de hibridização, permitem detectar todos os tipos de HPV. Além disso, este método requer quantidades muito pequenas de DNA na

amostra biológica. Porém, os testes de PCR são suscetíveis à contaminação, levando a resultados falsos positivos (Hubbard, 2003).

A PCR é uma técnica valiosa porque permite a multiplicação *in vitro* de uma única região do DNA que pode ser detectada em largo espectro, como é o caso de muitas infecções virais. Pode ser aplicada para detecção de tipos específicos de HPV, determinação de carga viral, análise de sequenciamento e mutação.

O uso de ensaios de consenso permite a detecção de um número maior de tipos em uma única reação, uma vez que o par de *primers* é direcionado a uma região conservada do gene L1, usada para classificação formal dos diferentes tipos de HPV (Dehn et al., 2007). Existem diferentes *primers* de consenso disponíveis no mercado que se diferenciam principalmente pelo número de pares de base amplificados, capacidade em detectar infecções por múltiplos tipos e capacidade de amplificação, de acordo com a integridade do DNA da amostra biológica. O SPF (Kleter et al., 1999) é um par de *primers* que amplifica um fragmento de 65 pares de base, o par de *primers* GP5/6, e sua versão estendida GP5+/6+ amplifica um fragmento de 150 pares de base (de Roda Husman et al., 1995). Os *primers* degenerados MY09/11 (Bosch et al., 1995) e sua versão redelineada para aumentar a sensibilidade de amplificação de um espectro de tipos virais PGMY09/11 identificam um fragmento de 450 pares de base (Gravitt et al., 2000). A eficiência do teste é inversamente proporcional ao produto amplificado, pois *primers* que amplificam fragmentos menores são considerados

mais sensíveis e adequados para amostras com DNA menos preservado (Gravitt et al., 2000; Villa e Denny, 2006).

O espectro de genotipagem por esta técnica permite a discriminação de 27 tipos virais, 18 oncogênicos e 9 não oncogênicos. Além disso, os produtos de PCR podem ser genotipados por técnicas clássicas de biologia molecular como *Southern Blot* e *Dot Blot*, sequenciamento e Polimorfismo de fragmentos de Restrição (RFLP). Contudo, estas técnicas são pouco aplicáveis à rotina clínica (Hubbard, 2003). Hoje já existem dois novos testes, o Inno-LiPA (Innogenetics, Tense, Belgica) e Linear Array HPV genotyping test Roche (van Hamont et al., 2006), porém também pouco aplicáveis à rotina.

Embora o risco relativo da maioria dos tipos de HPV de alto risco seja ainda desconhecido e exista diferença do seu potencial oncogênico, a detecção de tipos específicos pela técnica de PCR é necessária para que se possa conhecer esse risco (Khan et al., 2005; Rabelo-Santos et al., 2005). O risco de neoplasia cervical associada com infecção pelo tipo individual do HPV tem sido examinado em estudos caso-controle e de corte transversal. Testes moleculares que distinguem os HPV 16 e 18 de outros tipos oncogênicos poderiam identificar mulheres com risco aumentado de NIC 3 ou lesões mais graves, e poderiam permitir uma conduta menos agressiva em mulheres com infecção por tipos não oncogênicos de HPV (Khan et al., 2005).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma associação entre o aumento da carga viral de HPV e o risco para câncer cervical (Sarian et al., 2003; Tulio et al., 2007). A acurácia da medida da carga viral pela CH 2 principalmente para infecções múltiplas deixa dúvidas, uma vez que o teste não detecta tipos específicos. Além disso, existe uma necessidade de se esclarecer quando a medida da carga é o resultado de poucas células com grande número de vírus ou muitas células com poucos vírus (Wang et al., 2004).

Para realização da PCR há a necessidade da extração de ácidos nucleicos, sendo que na literatura existem varias técnicas descritas com essa finalidade, utilizando substâncias e protocolos diferentes (Mesquita et al, 2001; Fernandes et al., 2004; Huang et al., 2004). Esfregaços fixados e tecidos incluídos em parafina constituem uma importante fonte de material para estudos epidemiológicos retrospectivos. Contudo, tem sido demonstrado que a fixação de secreções ou de tecido, dependendo do tempo e do fixador utilizado, pode resultar na degradação do DNA, prejudicando significativamente a sua amplificação por PCR após um período de estocagem (Poljak et al., 2002; Fernandes et al., 2004).

Dubeau et al., (1986), utilizando amostras bem fixadas e sem autólise de tecido viável conseguiram a recuperação de DNA de alto peso molecular. No entanto, encontraram limitações quando usaram amostras contendo fixadores como ácido pícrico ou cloreto de mercúrio, onde o DNA recuperado não estava intacto, pois o tempo de fixação nesses tipos de fixadores diminui a quantidade de DNA intacto disponível (Poljak et al., 2002, Fernandes et al., 2004).

Da mesma forma, células de esfoliado cervical coletado em *Preserv Cyt*, um meio baseado em metanol que é utilizado para realização da citologia líquida, o *Thin Prep*, tiveram degradação parcial de DNA após vários anos de estocagem (Castle et al., 2003, Iftner et al., 2003, Huang et al., 2004).

Por outro lado, Mesquita et al., (2001) após comparação de tecidos fixados e não fixados em formol, não verificaram diferenças na amplificação do DNA quanto a esta variável, concluindo que tecidos fixados em formol potencialmente fornecem DNA de qualidade e quantidade suficientes para experimentos em biologia molecular.

Poljak et al., (2002) utilizaram um método comercial de extração de DNA em 325 amostras, sendo que 185 dessas continham reagente desnaturante. O DNA foi recuperado de 323 (99%) amostras. Rabelo-Santos et al (2005) recuperaram 90% em um estudo realizado exclusivamente com amostras desnaturadas e estocadas a -20°C por 18 meses, apenas em meio STM.

Assim, tem sido demonstrado que o material desnaturado utilizado para realização da CH 2 poderia ser aproveitado para determinação e tipagem do HPV por PCR, mesmo após um período de estocagem (Poljak et al., 2002; Rabelo-Santos et al., 2005).

A CH 2 tem sido extensivamente utilizada desde 1998; conseqüentemente, existe um grande número de amostras estocadas em muitos laboratórios. É

possível usar a PCR para identificar o tipo específico do vírus dessas amostras, desnaturadas e congeladas a -20°C que tenham sido estocadas em STM para uso na CH 2. Análises do tipo específico de HPV de amostras utilizadas para CH 2 podem ser úteis para estudos retrospectivos que contribuirão no levantamento da história natural dessas lesões (Rabelo-Santos et al., 2005).

Assim, tornou-se desejável a realização de um estudo para avaliar a possibilidade de recuperação de DNA-HPV viável para análises por PCR de material biológico desnaturado e estocado em UCM (Patent / 6969585) por diferentes períodos de tempo.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a recuperação e estabilidade do DNA para detecção do HPV através da PCR utilizando amostras estocadas por até 24 meses em Universal Collection Medium (UCM) com reagente desnaturante.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a recuperação do DNA-HPV, após, 6, 12 e 24 meses no meio de coleta UCM com reagente desnaturante.
- Avaliar a qualidade do DNA-HPV recuperado após 6, 12 e 24 meses no meio de coleta UCM com reagente desnaturante.

3. Materiais e Métodos

3.1. Extração do DNA do material desnaturado

Quatrocentos e cinquenta microlitros (450µl) do material desnaturado foram transferidos para um *eppendorf* de 1,5ml, contendo 1,0ml de solução de precipitação composta de: 2ml de NaAc 3 M PH 5.2, 200µg de glicogênio e 100ml de etanol absoluto. O tubo foi passado no vortex em alta velocidade e o material foi colocado em freezer a - 70°C por uma noite. Após centrifugação a 12.000 X g por 15 minutos a 4°C, o *pellet* foi lavado com 400µl de etanol 70% gelado e centrifugado a 3.000 Xg por 15 minutos. O *pellet* foi re-suspendido em 200µl de tampão TE (Tris 1mM EDTA 100uM, PH 8.2) e estocado a -20°C.

3.2. Quantificação de DNA-HPV em espectrofotômetro

A quantificação do DNA foi determinada por densidade óptica (OD) valor de 260nm e a pureza pela relação 260/280nm em espectrofotômetro (DU-70, Beckman). As amostras foram diluídas em 1/100 e passadas no vortex por 30 segundos para homogeneização, sendo o volume utilizado para quantificação de 500µl.

3.3. Reação em Cadeia da Polimerase para β - Globina

Foram utilizados 0.4 μ M dos *primers* G73 (5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') e G74 (5'-CAACTTCATCCACGTTACC-3') que amplificam 268 pb, adicionados a 3,0mM MgCL₂, 0,25mM dNTPs, 0,05 unidades de Taq polymerase e 2,5 μ l da amostra, em um volume final de 25 μ l.

3.4 - Reação em Cadeia da Polimerase para HPV

Para o *template* foram utilizados os *primers* PGMY09 e PGMY11, que são derivados da região L1 que amplifica 450pb. Estes *primers* foram redesenhados a partir dos *primers* consenso MY09 e MY11 para aumentar a sensibilidade de amplificação de um espectro de tipos virais e mais os reagentes: MGCl₂ 25 μ M, dNTPs 100uM e 0,05U de Taq Platinum. A detecção do produto amplificado foi realizada por eletroforese em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio.

4. Publicação

Recovery of DNA for the detection of HPV from clinical cervical specimens stored for up to two years in Universal Collection Medium (UCM) with denaturing reagent

Elisabete A Campos¹, José Antonio Simões¹, Silvia H Rabelo-Santos², Luis Otávio Sarian¹, Denise Lima de Moraes¹, José Eduardo Levi³, Sophie F M Derchain¹

¹Department of Obstetrics and Gynecology, school of Medicine Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brazil ²School of Pharmacy, Federal University of Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brazil, ³Laboratory of Virology, Institute of Tropical Medicine, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

Artigo submetido à revista Journal of Virological Methods

Confirmação de recebimento do artigo

Ms. Ref. No.: VIRMET-D-07-00197 Title: Recovery of DNA for the detection of HPV from clinical cervical specimens stored for up to two years in Universal Collection Medium (UCM) with Denaturing Reagent
Journal of Virological Methods

Dear Dr. Jose A. Simoes, Your submission entitled "Recovery of DNA for the detection of HPV from clinical cervical specimens stored for up to two years in Universal Collection Medium (UCM) with Denaturing Reagent" has been assigned the following manuscript number: VIRMET-D-07-00197.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/virmet/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

A. Zuckerman

Editor-in-Chief

Journal of Virological Methods

Abstract

The recovery and stability of DNA for the detection of HPV by PCR from clinical specimens stored for up to two years in universal collection medium (UCM) with denatured reagent at -20°C were evaluated in 60 HPV-positive cervical specimens. Samples were collected from women who had Pap smear cytology results of CIN 2 or CIN 3. After removing the aliquot required for carrying out the hybrid capture 2 assay for the identification of HPV-DNA, the samples were stored for 6, 12 or 24 months (20 samples for each storage time). DNA-HPV extraction was performed according to a protocol specifically designed for this type of material. The presence and quality of DNA was confirmed by human β -globin detection using the consensus primers G73 and G74. HPV was detected using the consensus primers PGMY09 and PGMY11. The DNA extracted from the denatured material was recovered in 57 (95%) of the samples studied. DNA-HPV failed to be detected in one of the recovered samples. The recovery and stability of DNA-HPV from cervical samples stored for up to two years in UCM were excellent.

Key words: HPV-DNA; universal collection medium; denaturing reagent; detection; storage; cervical cancer.

1. Introduction

Persistent infection with oncogenic types of human papillomavirus (HPV) has been established as the primary risk factor for the development of cervical cancer and is known to be a prerequisite for progression to neoplastic disease (Bosch et al., 1995; Walboomers et al., 1999). Almost all cases of invasive cervical cancer are HPV-positive. New techniques of cervical cancer screening by HPV detection have become available, based mainly on the molecular detection of viral DNA. Molecular tools permit identification of many different HPV types, including those considered to be of high oncogenic potential (Munoz et al., 2003; Moberg et al., 2003).

Accurate identification of HPV genotypes depends mainly on the quality of the DNA sample, which may be affected by several factors including the presence of denaturing agents and the conditions and time of storage. Therefore, the sensitivity and specificity of the genotyping method are moderately influenced by pre-testing events, mainly those related to the quality of the DNA (Mesquita et al., 2001; Melo et al., 2005).

Diagnosing HPV infection involves detection of the genetic information of HPV in samples of cells collected from the infection site. Cytological samples are generally collected in PreservCyt (ThinPrep, Cytoc, Boxborough, Mass., USA) or in Specimen Transport Medium (STM - Digene Corp, Gaithersburg, MA, USA), (Carozzi et al., 2005). More recently, Universal Collection Medium (UCM - Digene Corp, Gaithersburg, MA, USA) has been proposed for the collection of these samples.

The signal-amplified hybridization microplate-based Hybrid Capture 2 assay (HC2, Digene Corp, Gaithersburg, Maryland, USA) is the only commercially available HPV-DNA detection assay for use in cytological samples that has sufficient scientific data to support its performance in different clinical settings. Therefore, HC2 has become the standard test for HPV detection in many countries and has been used extensively in large clinical studies (Clavel et al., 1999; Cuzick et al., 2000). However, this test does not allow determination of specific HPV types. HPV typing is performed using polymerase chain reaction (PCR), which, in addition to identifying specific HPV types, also permits determination of viral load, sequence analysis and mutation.

The medium initially used in the collection of material for carrying out HC2 was STM. It has already been demonstrated that PCR may be used for HPV detection in samples that have been collected and stored in this medium (Poljak et al., 2002; Rabelo et al., 2005). Poljak et al. (2002) described a method for extracting DNA from samples preserved in STM containing denaturing reagent. These authors were successful in extracting DNA from 98% of the HC2-positive samples that had been frozen at -70°C. Following a meticulous extraction protocol, Rabelo Santos et al. (2005) recovered adequate amounts of DNA in 90% of samples stored for 18 months in STM at -20°C. STM is a water-based proprietary aliphatic amine designed as a DNA preservative (Carozzi et al., 2005); however, it is not suitable for use in morphological analysis.

Therefore, UCM was recently developed to permit both morphological analysis and HC2 testing. The UCM-based HC2 maintains the diagnostic accuracy of the STM-based HC2 in the diagnosis of high- and low-risk HPV (Taha et al.,

2006). This medium is comprised of buffered, water-based solutions that include a preservative such as a mixture of one or more alcohols, a cross-linking agent and an agent to inhibit degradation of RNA, DNA and protein (UCM Patent 6969585). However, as far as we know, no study has been carried out to determine whether the DNA-HPV collected in this medium may be extracted and detected following the addition of a denaturing agent and after freezing for long periods of time.

The objective of this study was, therefore, to evaluate the recovery and stability of DNA for the detection of HPV using PCR from clinical specimens stored for up to two years in UCM with a denatured reagent.

2. Materials and Methods

Sixty HPV-positive cervical specimens collected between 2003 and 2005 from women with Pap smear cytology CIN 2 or CIN 3, who were receiving care at the Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil, were enrolled in this study. All samples were stored in UCM and had been frozen at -20°C following the addition of the denaturing reagent and the removal of the aliquot required for HC2 testing for the identification of HPV-DNA. The samples were stored for 6, 12 or 24 months (20 samples for each storage time).

2.1. DNA extraction from denaturing samples

Total DNA was extracted from the samples containing the denaturing reagent according to the protocol used by Rabelo-Santos et al. (2005). Briefly, a 450µL aliquot of the denatured specimen was transferred to a 1.5mL Eppendorf tube with 1.0 mL precipitation solution composed of 2mL of 3M NaAc pH 5.2, 200µg of glycogen (prepared with 10µL of 20mg/mL glycogen solution) and 100 mL of absolute ethanol. Following vortex mixing, the solution remained overnight in a freezer at -70°C. On the following day, the solution was centrifuged at 12,000Xg for 15 minutes at 4°C. After washing the pellet with 400µL of 70% ethanol, it was centrifuged at 3,000Xg for 15 minutes. The tube was inverted for 30 minutes to allow the ethanol to evaporate, and the pellet was then diluted in a 200µL 1x Tris-

EDTA buffer (Tris 1mM EDTA 100uM, pH 8.2) and stored at –20°C prior to HPV detection.

2.2. DNA quantification

The quantification of DNA and its purity were determined by optical density (OD) using spectrophotometry (DU-70, Beckman CA). Readings were taken at 260nm and 280nm. The concentration of DNA in solution was measured by reading absorbance at a wavelength of 260nm (one OD = 50 ng). Samples were diluted at 1:100 with sterile water in a 1.5 mL tube and transferred to a 1 mL quartz cuvette. DNA purity was then evaluated by means of the absorbance ratio at 260 and 280nm. Ratios in the range of 1.7 – 2.0 indicated pure DNA concentration. The final DNA concentration present in each sample was determined by the formula $OD_{260} \times 50 \times \text{factor of dilution} = \text{ng}/\mu\text{L}$, where OD 260 represents the absorbance of the samples at 260nm.

2.3. β - Globin amplification

The samples were submitted to PCR with β -globin primers G73 (5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') and G74 (5'-CAACTTCATCCACGTTTACC-3'), resulting in a 268 base pair amplicon to exclude false-negative results, which served as an internal control to evaluate the quality and sufficiency of the DNA present in the sample (Greer et al. 1991). Two and a half μL of DNA were added to a mix containing 0.4 μM G73/74 primers, 3.0 mM MgCl_2 , 0.25 mM dNTPs and 0.05 units of Taq polymerase in a final volume of 25 μL . Each run was tested with quality-control samples that had been previously shown to be β -globin positive.

2.4. HPV-DNA detection

HPV-DNA was amplified in replicate tubes using L1 consensus primers PGMY 09 and PGMY 11 that amplify a 450 bp fragment (Gravitt et al., 2000, Perrons et al., 2002). Two and a half μ L of DNA were added to a PCR mix containing 0.2 mM PGMY 09/11 primers, 4.0 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs and 0.1 units of Taq Platinum in a final volume of 25 μ L. During each PCR run all samples were tested together with one negative control (water) and one positive control (HPV 18-containing cells) (Levi et al., 2002, Rabelo-Santos et al 2005).

3. Results

The DNA extracted from the denatured material was successfully recovered in 57 (95%) of the samples studied. DNA failed to be recovered in three samples, one from each storage time evaluated (β -globin was not identified). DNA-HPV was not be detected in only one sample that had been stored for 24 months. (Table)

4. Discussion

Our study showed that exposure to denaturing reagents did not deteriorates DNA quality in cervical smear following storage in UCM for up to 24 months at -20°C. The recovery and stability of DNA for the detection of HPV using PCR from clinical specimens stored in UCM were excellent.

Studies have suggested that time-related DNA degradation results in decreased DNA recovery rates due to fragmentation of genomic DNA. In fact, a

study of formalin-fixed histology samples found that the age of the sample from which DNA can successfully be recovered is increased if a shorter β -globin gene fragment is targeted for amplification (Ben-Ezra et al., 1991). In the present study, the three samples from which it was not possible to extract DNA had been stored for 6, 12 and 24 months, suggesting that storage time cannot be the only cause of failure to recover DNA.

In a study carried out by Castle et al. (2003), specimens preserved in *Preserve Cyt*[®] for varying periods of time were tested for preservation of DNA-HPV, β -globin DNA and cell nuclear features. These investigators also found that detection of DNA-HPV by the HC2 assay was not affected by storage time. Nevertheless, in approximately 15% of specimens, amplification for any β -globin DNA fragment could not be performed after five years of storage. However, that specimens were collected and stored at uncontrolled ambient temperatures until the beginning of 1996 when at which time specimens finally began to be stored in a well-controlled temperature environment. This leads us to believe that storage conditions are important as storage time or even more so.

However, our study have limitations such as limited number of specimens tested for each one of the three storage periods and that the samples tested from the different periods of storage time were different. We realize that the ideal design for the study of possible damage caused to samples stored in denaturing reagent would have been to evaluate the same sample at different storage times. Unfortunately, this was not possible because the remaining volume of the stored samples was only sufficient to carry out one attempt at DNA-HPV extraction, since

the only available protocol for denatured samples in our institute required 450uL. New methods are being developed that will require much smaller volumes for DNA extraction, as is the case for samples with no addition of denaturing agents. This would be highly desirable, since practically all the cervical samples for HC2 are stored in denaturing reagent.

Despite these limitations, as far as we know this is the first study on UCM storage with HPV-positive samples. Previous studies on this subject were carried out only on STM, since this was the only collection medium used in performing the HC2 assay (Poljak et al., 2002; Rabelo et al., 2005). Currently, there is a trend towards substituting STM by UCM in view of the possible advantages of the latter method, particularly with respect to the possibility that it may also permit cytological evaluation of cervical samples collected in UCM. The data reported in the present study adds another possible advantage in the use of this medium since it appears to be just as good as STM for the recovery of nucleic material after long periods of storage.

One of the major advantages of detecting adequate amounts of intact DNA for HPV DNA amplification by PCR in stored HC2-tested samples is the identification of the specific virus genotypes in material stored following large studies. Valuable information regarding the persistence of HPV-DNA may eventually be helpful in making decisions with respect to individual treatments, in population and epidemiological programs and also in vaccine development.

Our data are encouraging, showing that preserved stability of nucleic acids in cervical specimens collected in UCM was good. Furthermore, it should encourage researchers with stored HC2 material to go back to their samples and

perform innovative studies focused on specific-site DNA-HPV amplification. Valuable and reliable information may be obtained from storage material and may therefore eliminate the need to carry out prospective studies that are much more time consuming and expensive.

Acknowledgments

This study was funded by a research grant from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Grant #05/54482-0).

Table: DNA extraction and DNA-HPV detection in cervical samples collected and stored at -20°C in Universal Collect Medium with denaturing reagent

Storage time	Number of samples	DNA-extraction*	HPV-DNA detection **
6 months	20	19 (95%)	19 (100%)
12 months	20	19 (95%)	19 (100%)
24 months	20	19 (95%)	18 (95%)
TOTAL	60	57 (95%)	56 (98%)

* evaluated by β -Globin amplification.

** Out of the samples with extracted DNA (57%).

References

- Ben-Ezra, J., Johnson, D.A., Rossi, J., Cook, N., Wu, A., 1991. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. *J. Histochem. Cytochem.* 39, 351-354.
- Bosch, F.X., Manos, M.M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A.M., Peto, J., Schiffman, M.H., Moreno, V., Kurman, R., Shah, K.V., 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J. Natl. Cancer Inst.* 87, 796-802.
- Carozzi, F.M., Del Mistro, A., Confortini, M., Sani, C., Puliti, D., Trevisan, R., De Marco, L., Tos, A.G., Girlando, S., Palma, P.D., Pellegrini, A., Schiboni, M.L., Crucitti, P., Pierotti, P., Vignato, A., Ronco, G., 2005. Reproducibility of HPV DNA testing by Hybrid Capture 2 in a screening setting. *Am. J. Clin. Pathol.* 124, 716-721.
- Castle, P.E., Lorincz, A.T., Scott, D.R., Sherman, M.E., Glass, A.G., Rush, B.B., Wacholder, S., Burk, R.D., Manos, M.M., Schussler, J.E., Macomber, P., Schiffman, M., 2003. Comparison between prototype hybrid capture 3 and hybrid capture 2 human papillomavirus DNA assay for detection of high grade cervical Intraepithelial neoplasia and cancer. *J. Clin. Microbiol.*, 4022-4030.
- Clavel, C., Masure, M., Bory, J.P., Putaud, I., Mangeonjean, C., Lorenzato, M., Gabriel, R., Quereux, C., Birembaut, P., 1999. Hybrid Capture II-based human papillomavirus detection, a sensitive test to detect in routine high-

- grade cervical lesions: a preliminary study on 1518 women. Br. J. Cancer 80, 1306-1311.
- Cuzick, J., Sasieni, P., Davies, P., Adams, J., Normand, C., Frater, A., van Ballegooijen, M., van den Akker-van Marle, E., 2000. A systematic review of the role of human papillomavirus (HPV) testing within a cervical screening programme: summary and conclusions. Br. J. Cancer 83, 561-565.
- Gravitt, P.E., Peyton, C.L., Alessi, T. Q., Wheeler, C.M., Coutlee, F., Hildesheim, A., Schiffman, M.H., Scott, D.R., Apple, R.J., 2000. Improved amplification of genital human papillomaviruses. J. Clin. Microbiol. 38, 357-361.
- Greer, C.E., Peterson, S.L, Kiviat, N.B, Manos, M.M., 1991. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. Am. J. Clin. Pathol. 95, 117-124.
- Levi, J.E., Kleter, B., Quint, W.G., Fink, M.C., Canto, C.L., Matsubara, R., Linhares, I., Segurado, A., Vanderborght, B., Neto, J.E., Van Doorn, L.J., 2002. High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human Immunodeficiency virus-infected women in Brazil. J. Clin. Microbiol. 40(9), 3341-3345.
- Melo, A., Roa, I., Montenegro, S., Capurro, I., Roa, J.C., 2005. Detection of human papillomavirus in cytologic samples or biopsies of the cervix. Rev. Med. Chil. 133, 639-644.
- Mesquita, R.A., Anzai, E.K., Oliveira, R.N., Nunes, F.D., 2001. Evaluation of 3 methods of DNA extraction from paraffin-embedded material for the

amplification of genomic DNA using PCR. *Pesqui. Odontol. Bras.* 15, 314-319.

Moberg, M., Gustavsson, I., Gyllensten, U., 2003. Real-time PCR-based system for simultaneous quantification of human papillomavirus types associated with high risk of cervical cancer. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3221-3228.

Munoz, N., Bosch, F.X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K.V., Snijders, P.J., Meijer, C.J., International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group, 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 348, 518-527.

Perrons, C., Kleter, B., Jelley, R., Jalal, H., Quint, W., Tedder, R., 2002. Detection and genotyping of human papillomavirus DNA by SPF10 and MY09/11 primers in cervical cells taken from women attending a colposcopy clinic. *J. Med. Virol.* 67, 246-252.

Poljak, M., Marin, I.J., Seme, K., Vince, A., 2002. Hybrid Capture II HPV test detects at least 15 human papillomavirus genotypes not included in its current high-risk probe cocktail. *J. Clin. Virol.* 25, Suppl 3, S89-S97.

Rabelo-Santos, S.H., Levi, J.E., Derchain, S.F., Sarian, L.O., Zeferino, L.C., Messias, S., Moraes, D.L., Campos, E.A., Syrjanen, K.J., 2005. DNA recovery from hybrid capture II samples stored in specimen transport medium with denaturing reagent, for the detection of human papillomavirus by PCR. *J. Virol. Methods* 126, 197-201.

Taha, N.S., Focchi, J., Ribalta, J.C., Castelo, A., Lorincz, A., Dôres, G.B., 2006.

Universal Collection Medium (UCM) is as suitable as the Standard Transport Medium (STM) for Hybrid Capture II (HC-2) assay. J. Clin. Virol. 36, 32-35.

Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snijders, P.J., Peto, J., Meijer, C.J., Munoz, N., 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J. Pathol. 189, 12-19.

5. Conclusões

- A exposição ao reagente desnaturante não causou a deterioração da qualidade do DNA.
- A recuperação e estabilidade do DNA-HPV foram excelentes após 24 meses de estocagem.

6. Referências Bibliográficas

Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. **J Natl Cancer Inst** 1995; 87:796-802.

Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **J Clin Pathol** 2002; 55:244-65.

Castle PE, Solomon D, Hildesheim A, Herrero R, Bratt MC, Sherman ME. Stability of archived liquid-based cervical cytologic specimens. **Cancer Cytopathol** 2003; 99:89-96.

de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJC, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by polymerase chain reaction. **J Gen Virol** 1995; 76:1057-62.

Dehn D, Torkko KC, Shroyer KR. Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. **Cancer** 2007; 111:1-14.

Dell G, Gaston K. Contributions in the domain of. cancer research: Review human papillomaviruses and their role in cervical cancer **Cell Mol Life Sci** 2001; 58:923-42.

Dubeau L, Chandler LA, Gralow JR, Nichols PW, Jones PA. Southern blot analysis of DNA extracted from formalin-fixed pathology specimens. **J Cancer Res** 1986; 46:2964-9.

Fernandes JV, Meissner RV, Fernandes TAAM, Rocha LRM, Cabral MC, Villa LL. Comparasion of three extraction protocols from formaldehyde-fixed and paraffin-embedded tissues. **J Bras Patol Med Lab** 2004; 40:141-6.

Gravitt PE, Peyton RJ, Apple RJ, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F. Improved amplification of genital human papillomavirus. **J Clin Microbiol** 2000; 38:357-61.

Ho G, Bierman R, Beardsley LCCJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. **N Engl J Med** 1998; 8:338-423.

Huang L, Chao S, Chen P, Chou H. Multiple HPV genotypes in cervical carcinomas: improved DNA detection and typing in archival tissues. **J Clin Virol** 2004; 29:271-6.

Hubbard R. Human papillomavirus testing methods. **Arch Pathol Labor Med** 2003; 127:940-5.

Hudelist G, Manavi M, Pischinger KID, Watkins_Riedel T, Singer CF, Kubista E. et al. Physical state and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. **Gynecol Oncol** 2004; 92:873-80.

Iftner T, Villa LL, Human papillomavirus technologies **J Natl Cancer Inst Monogr** 2003; 31:80-8.

Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human

papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. **J Nat Cancer Institute** 2005; 97:1072-9.

Kleter B, van Doorn LJ, SchurauwenL, Molijn A, Sastrowijoto S, ter Schegget J. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. **J Clin Microbiol** 1999;37:2508-17.

Kroeff M. O câncer é curável? **Rev Bras de Cancerol** 2004; 49:4 205

Levi JE, Fernandes S, Tateno AF, Motta E, Lima L, Eluf-Neto J, et al. Presence of multiple human papillomavirus types in cercical samples from HIV- infected women. **Gynecol Oncol** 2004; 92:225-31.

Levi JE, Kleter B, Quint WGV, Fink MCS, Canto CLM, Matsubara, R, et al. High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human Immunodeficiency virus Infected women in Brazil. **J Clin Microbiol** 2002; 3341-5.

Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. **Obst Gynecol** 1992; 79:328-37.

Lorincz AT. Screening for cervical cancer: new alternatives and research. **Salud Publica Mex** 2003; 3:376-87.

Mesquita RA, Anzai EK, Oliveira RN, Nunes FD, Evaluation of three methods of DNA extraction from paraffin-embedded material for the amplification of genomic DNA by means of the PCR technique. **Pesq Odontol Bras** 2001; 15:314-9.

Poljak M, Marin IJ, Seme K, Vince A. Hybrid capture II HPV test detects at least 15 human papillomavirus genotypes not included in its current high risk probe cocktail. **J Clin Virol** 2002; 3:89-97.

Rabelo-Santos SH, Levi JE, Derchain SFM, Sarian LO, Zeferino LC, Messias S. DNA recovery from hybrid capture II samples stored in specimen transport medium with denaturing reagent, for the detection of human papillomavirus by PCR. **J Virol Methods** 2005; 126:197-201.

Sarian LOZ, Santos ALF, Derchain SFM, Figueiredo PG, Morais SS. Viral load of human papillomavirus as a predictor of the severity of cervical lesions in women with atypical cells at pap smear. **Rev Bras Ginecol Obstet** 2003; 25:365-70.

Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriaty A, O'Connor D, Prey M. Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. **JAMA** 2002; 24:2140-1.

Swan DC, Tucker RA, Tortolero-Luna G, Mitchell MF, Wideroff L, Unger ER et al. Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. **J Clin Microbiol** 1999; 37:1030-4.

Tulio S, Pereira LA, Neves FB, Pinto AP. Association between high-risk human papillomavirus DNA load detected by hybrid capture II and high-grade precursor lesions of cervical cancer in women. **J Patol Med Lab** 2007; 43:31-5.

van Hamont D, van Ham MAPC, Bakkers JMJE, Massuger LFAG, Melchers WJG. Evaluation of the spf10-inno lipa human papillomavirus (hvp) genotyping test and the Roche linear Array hvp genotyping test. **J Clin Microbiol** 2006; 44:3122-9.

Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. **J Gen Virol** 2000; 81:2959-68.

Villa LL, Denny L. Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. **Int J Gynecol Obstet** 2006; 94:571-80.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol** 1999; 189:12-9.

Wang SS, Hildesheim A. Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. **J Nat Cancer Inst Monog** 2003; 31:35-40.

7. Bibliografia de Normatizações

França JL, Borges SM, Vasconcellos AC, Magalhães MHA. **Manual para normatização de publicações técnico-científicas**. 4^a ed., Editora UFMG, Belo Horizonte, 1998. 213p.

Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp. Ed. SAD – Deliberação CCPG-001/98 (alterada 2005).