



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA VOLUNTÁRIA – PICVOL

**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE UMA ESTRATÉGIA
MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE HPV**

Área do conhecimento: Genética
Subárea do conhecimento: Genética de microrganismos
Especialidade do conhecimento: Genética molecular e bioinformática

Relatório Final
Período da bolsa: de agosto de 2017 a julho de 2018

Este projeto é desenvolvido com bolsa de iniciação científica

PICVOL

Orientador: Dr. Marcus Vinicius de Aragão Batista
Autora: Maria da Conceição Viana Invenção



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

1. Resumo

Dentre as infecções sexualmente transmissíveis (IST), o Papilomavirus humano (HPV) destaca-se pela elevada incidência e prevalência no mundo, se configurando como principal causador do câncer cervical. Métodos de prevenção, como o exame Papanicolau, contribui para a identificação de lesões associadas ao HPV, mas apresentam como principal desvantagem a incidência de resultados falso-negativos. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi desenvolver e padronizar um teste molecular mais específico e sensível para a detecção de HPV em pacientes com lesões cervicais. O procedimento utilizado foi a técnica de PCR do tipo Multiplex, contendo *primers* referentes a onze tipos de HPV. Do total de 356 amostras de secreção cervical e positivas para HPV, 122 (34,3%) foram identificadas com algum tipo viral, com prevalência do tipo 45 (11%) que é considerado carcinogênico. Do total, 34 (9,5%) apresentaram dois ou três tipos do vírus HPV. Esses resultados mostraram que o teste apresentou sensibilidade e especificidade por reconhecer e distinguir diferentes tipos de Papilomavirus Humano.

2. Palavras-chave

HPV; diagnóstico molecular; lesões cervicais; PCR; multiplex.

3. Introdução

O Papilomavirus humano (HPV) é considerado um agente causador de infecção sexualmente transmissível (IST) capaz de atingir homens e mulheres (LIN, 2015). Atualmente apresenta mais de 200 tipos descritos na literatura (BERNARD et al., 2010; VILLIERS et al., 2004). No mundo, entre as causas do câncer do colo do útero, a infecção persistente do HPV é considerada a principal, enquanto que no Brasil é denotado como a segunda maior causa (DE LIMA et al., 2011; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

Do total, apenas 40 tipos infectam o trato genital, mas somente alguns podem apresentar alto risco, pois tem caráter oncogênico como os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59. Cerca de 70% dos casos de câncer de colo de útero são promovidos pela infecção dos tipos 16 e 18. Enquanto que, os condilomas genitais apresentam os tipos 6 e 11 que não apresentam potencial carcinogênico (BRASIL, 2014). Desse modo, realizar o diagnóstico e a genotipagem através de ferramentas cada vez mais precisas mostra-se como uma das formas de detectar com antecedência os riscos da paciente desenvolver lesão pré-maligna, assim como especificar o tratamento necessário de acordo com cada tipo encontrado (BRASIL, 2014).

O exame citopatológico (Papanicolau) é um dos métodos para identificar lesões que possam evoluir para o câncer do colo do útero. Dessa forma, é possibilitado que as pacientes recebam um tratamento de prevenção para que o quadro não seja agravado (BRASIL, 2014). Todavia, esse procedimento apresentam como desvantagem a incidência de resultados falso-negativo (SCHIFFMAN et al., 2015).

Nesse cenário, técnicas como a reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizada para detectar vírus através da amplificação do seu DNA mesmo em baixos níveis de carga viral, se apresenta como uma possível ferramenta mais precisa para diagnosticar resultados positivos (RITARI et al., 2012). O uso de primers degenerados, apesar de amplificar vários tipos de HPV, apresentam baixa

sensibilidade, conseqüentemente ocorre um aumento do número de falsos negativos.

Desta forma, o desenvolvimento de estratégias moleculares com maior eficácia se torna necessário para o diagnóstico preciso do HPV em lesões cervicais (ROCHA et al., 2010). Assim, o objetivo do presente trabalho é desenvolver e padronizar um teste molecular mais específico e sensível para a detecção de Papilomavirus humano em pacientes com lesões cervicais.

4. Revisão de literatura

Dentre as infecções sexualmente transmissíveis (IST), o Papilomavirus humano (HPV) destaca-se pela elevada incidência e prevalência, sendo descrito pela literatura mais de 200 tipos de HPV circulantes (BERNARD et al., 2010; VILLIERS et al., 2004), atingindo homens e mulheres (LIN, 2015). No mundo, se configura como principal causador do câncer cervical, e nos países em desenvolvimento, a exemplo do Brasil, é apontado como a segunda causa de câncer do colo do útero (LIMA et al., 2011; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008). Além disso, o HPV pode ser responsável pelo carcinoma vaginal, anal, vulvar e cabeça e pescoço (BURD, 2003).

Na América latina, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), 72 mil novos casos de câncer do colo do útero são diagnosticados a cada ano e destes, 33 mil evoluem para óbito. A região Nordeste do Brasil ocupa a terceira posição quanto a incidência da doença, com 18 casos a cada 100 mil habitantes, ficando atrás apenas das regiões Centro-oeste e Norte (UNB, 2013).

O HPV faz parte da família Papillomaviridae e se destaca por apresentar uma estrutura complexa, visto que o genoma de dupla fita de DNA tem tamanho aproximadamente de 8Kb e geralmente com oito genes. Dentre estes, o gene L1 é responsável por codificar a principal proteína do capsídeo, além disso é considerado bem conservado e a possibilidade de alinhamento nos demais tipos de Papilomavirus justifica a sua utilização para classificação e construção de árvores filogenéticas destes vírus (BERNARD et al., 2010; VILLIERS et al., 2004).

Dentre os 40 tipos de HPV que infectam o trato genital, alguns são considerados de alto risco, como os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59, visto que são oncogênicos, sendo os tipos 16 e 18 responsáveis por 70% dos casos de câncer do colo do útero. Já os tipos 6 e 11 são comumente encontrados nos condilomas genitais, no entanto não possuem potencial para desenvolvimento do câncer (BRASIL, 2014). Com isso é fundamental a utilização de ferramentas para diagnóstico e genotipagem de HPV a fim de detectar precocemente os riscos da paciente desenvolver lesão pré-maligna, bem como nortear a instituição do tratamento (BRASIL, 2014).

O exame citopatológico (Papanicolau) se configura como método que possibilita diagnosticar as lesões que podem ser tratadas antes de evoluir para o câncer (BRASIL, 2014). No entanto, este método apresenta como desvantagem a elevada incidência de resultados falso-negativo (SCHIFFMAN et al., 2015).

Algumas técnicas são utilizadas para detecção do vírus, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (RITARI et al., 2012). A PCR está fundamentada na amplificação do DNA de interesse, apresentando alta capacidade de identificar este, mesmo com baixos níveis de carga viral (LIMA et al., 2011). Entretanto, os *primers* utilizados nas reações de PCR são de extrema importância para a eficácia do teste diagnóstico. *Primers* degenerados amplificam uma ampla gama de HPVs, mas apresentam baixa sensibilidade, aumentando assim o número de falsos negativos. Desta forma, o desenvolvimento de estratégias moleculares mais eficientes se torna necessário para o diagnóstico preciso do HPV em lesões cervicais (ROCHA et al., 2010).

Diante do exposto, este estudo se justifica pela necessidade de estabelecer testes moleculares mais sensíveis e de amplo espectro para detecção de HPV, associado à caracterização clínica de mulheres atendidas no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) com lesões cervicais, contribuindo desta forma para a diminuição do impacto, tanto para a paciente como ao sistema de saúde, das doenças causadas pelo HPV.

5. Objetivos

Objetivo geral:

Desenvolver e padronizar um teste molecular mais específico e sensível para a detecção de Papilomavirus humano em pacientes do estado de Sergipe que apresentam lesões cervicais.

Objetivos específicos:

- Estabelecer *primers* específicos para a detecção dos principais tipos de HPV;
- Padronizar reações de PCR do tipo multiplex para o diagnóstico e genotipagem de HPV;
- Analisar comparativamente a sensibilidade e especificidade do teste padronizado;
- Determinar a prevalência dos tipos de HPV circulantes no estado de Sergipe.

6. Metodologia

Trata-se de um estudo descritivo, do tipo corte transversal comparativo, de abordagem quantitativa e qualitativa para desenvolvimento e aplicação de testes moleculares para detecção de HPV. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Sergipe (UFS) sob número de protocolo CAAE: 23374014100005545.

Quanto a população e amostra, o estudo foi conduzido em pacientes submetidas ao exame ginecológico na Unidade de Ginecologia do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) em Aracaju, estado de Sergipe, que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

As amostras foram obtidas a partir de secreção cervical de um total de 356 pacientes do sexo feminino com lesões epiteliais no colo do útero. Para coleta dos dados sócio comportamentais, todos os sujeitos do estudo responderam um questionário contendo as seguintes variáveis: idade, origem, uso de preservativos nas relações sexuais, hábito de fumar e histórico de ISTs.

Em seguida, foi realizada a extração do DNA das amostras cervicais utilizando o kit Purelink genomic DNA mini kit (Invitrogen®). O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro do tipo NanoDrop, e estocado a -20°C para a realização das PCRs.

A estratégia molecular para a detecção do HPV foi baseada em reações de PCR do tipo Multiplex, utilizando *primers* específicos para detecção dos tipos de HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 66. Estes *primers* foram desenvolvidos utilizando a ferramenta computacional Primer3Plus (UNTERGASSER et al., 2012). Para realização da PCR multiplex, os *primers* foram organizados em três blocos (Tabela 1). *Primers* para β -globina humana foram utilizados para controle da qualidade do DNA obtido.

O protocolo da PCR multiplex conteve 25 μ L de volume final, sendo 4 μ L de mistura de *primer* (cada bloco) e solução mix contendo 5x Buffer, 2 mM MgCl₂, 1,2 mM dNTPs, 0,5 U de Taq-polimerase e 4 μ L de DNA. Os parâmetros utilizados foram desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos; 40 ciclos - 95°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 50 segundos, extensão 72°C por 10 segundos e por fim

72°C por 10 segundos (ROMERO-PASTRANA, 2012; TSAKOIANNIS et al., 2015). Sendo essa programação ajustada ao longo do processo de padronização para evitar o surgimento de bandas inespecíficas. Os produtos da reação foram corados com corante Blue - Juice e visualizados em eletroforese em gel de agarose a 2% por meio do transiluminador UV.

Tabela 1. Sequência de *primers* organizados em três blocos para identificação de tipos de HPV através da técnica PCR multiplex.

Bloco	Primer	Sequência	Peso molecular (bp)
I	HPV-16L1 F	5'- CAC TAT TTT GGA GGA CTG GAA T -3'	291
	HPV-16L1 R	5'- GAT GAG GTG GTG GGT GTA GC -3'	
	HPV-45L1 F	5'- TTT TAT CAT GCA GGC AGT TCC -3'	233
	HPV-45L1 R	5'- CCA CGA CCA ATT TCC ATA CC -3'	
	HPV-66L1 F	5'- CGC CGT AAA CGT ATT CCC TA -3'	168
	HPV-66L1 R	5'- CCA ACA GCA AGC AAC CTA GA -3'	
	HPV-11L1 F	5'- GAA TAC ATG CGC CAT GTG GA -3'	357
	HPV-11L1 R	5'- AGC AGA CGT CCG TCC TCG AT -3'	
II	HPV-18L1 F	5'- GCC CCT GCC TCT ACA CAG TA -3'	292
	HPV-18L1 R	5'- ATC CTG CTT ATT GCC ACC AC -3'	
	HPV-33L1 F	5'- CAA CGT GCT CAG GGA CAC -3'	202
	HPV-33L1 R	5'- GGG AGG TGT GGT CAA TCC -3'	
	HPV-35L1 F	5'- GTA GGT CGT GGT CAG CCA TT -3'	227
	HPV-35L1 R	5'- TGG TTA GCA TTA CAA GGT GTG C -3'	
	HPV-6LCR F	5'- TAG GGG ACG GTC CTC TAT TC -3'	259
	HPV-6LCR R	5'- GCA ACA GCC TCT GAG TCA CA -3'	
III	HPV-31L1 F	5'- CAA CGT GCT CAG GGA CAC -3'	291
	HPV-31L1 R	5'- GGG AGG TGT GGT CAA TCC -3'	
	HPV-51L1 F	5'- TCC AAT ACC TAA AAC CTC AAC G -3'	155
	HPV-51L1 R	5'- CAC AAC CCC ACA CCA ACC TA -3'	
	HPV-58L1 F	5'- GAT TTG TTA CCT CCC AGG CTA TT -3'	233
	HPV-58L1 R	5'- CTT TTT GCG TTT GGT GGA TG -3'	

Posteriormente foi construído um banco de dados utilizando o programa Excel versão 2010 com as informações obtidas no levantamento sócio demográfico e com

os resultados das PCRs. E, a partir disso, foram calculadas as frequências e proporções para a variável categórica, tipos de HPV, com a finalidade de determinar a prevalência dos tipos de HPV encontrados no estado de Sergipe.

7. Resultados e discussão

Foram coletadas 356 amostras contendo produtos da endocérvice, obtidas através do exame Papanicolau realizado em mulheres com lesões cervicais atendidas no CAISM (Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher). A partir disso, foi realizada a extração do DNA e posteriormente quantificados, conforme protocolo supracitado. Quanto aos dados sócio demográficos, as participantes da pesquisa têm idade entre 18 e 70 anos e o quadro clínico através de biópsias mostrou que as mesmas possuem lesões variando de LIE I a LIE III, cervicite ou carcinoma.

Os procedimentos convencionais de genotipagem de HPV, geralmente identificam um tipo por teste (POTOCNIK et al., 2007; VAN BEURDEN et al., 1998). Dessa forma, a análise de vários tipos demanda mais tempo e investimento financeiro. As reações de PCR do tipo multiplex correspondem a uma estratégia molecular alternativa a essas demandas, pois, utiliza mais de um *primer* por procedimento, assim, há a possibilidade de identificar mais de um tipo de HPV por teste. Isso representa baixo custo e pode ser feito em laboratórios simples em um curto espaço de tempo (ELNIFRO et al., 2000; SOTLAR et al., 2004; TSAKOGIANNIS et al., 2015).

Para o processo de padronização do multiplex PCR, o qual a programação inicial foi baseada no trabalho de TSAKOGIANNIS et al. (2015), foram utilizadas três amostras (denominadas 333, 365 e 366). Quanto aos resultados, verificou-se que a amostra 333 foi positiva para os tipos de HPV 16, 66 e 31; a amostra 365 para o tipo 18 e a amostra 366 os tipos 16 e 45 (Figura 1).

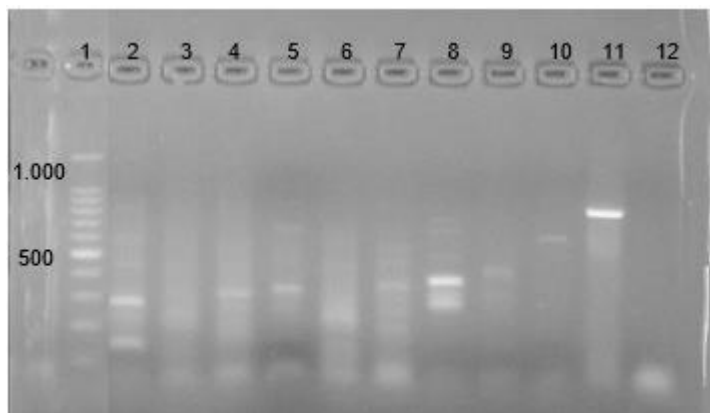


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 2%. Produtos de amplificação por PCR em DNA de amostras de HPV. Poço 1: Peso molecular (PM); Poços 2-4: amostra 333 (blocos 1, 2 e 3, respectivamente) foram identificados os tipos 66 e 16 no bloco 1 e tipo 33 no bloco3; Poços 5-7: amostra 365 (blocos 1, 2 e 3, respectivamente) foi identificado o tipo 16 no bloco 1 e banda inespecífica no bloco 3; Poços 8-10: amostra 366 (blocos 1, 2 e 3, respectivamente) foram identificados os tipos 11 e 16 no bloco 1 e banda inespecífica no bloco 3; Poço 11: controle positivo; Poço 12: controle negativo.

Devido ao surgimento de bandas inespecíficas com a programação inicialmente testada com temperatura de anelamento de 58 °C, a mesma foi alterada para 59 °C, 60 °C, 62 °C, objetivando alcançar uma temperatura de Melting em que a maioria dos *primers* se liguem aos fragmentos, evitando assim a presença das bandas inespecíficas supracitadas. No entanto, após realização dos protocolos com cada uma dessas temperaturas, foi possível perceber que a quantidade desse tipo de banda aumentava a cada protocolo testado.

Sendo assim, dentre os resultados obtidos com as temperaturas mencionadas anteriormente, o que teve a menor proporção de bandas inespecíficas foi aquele cuja programação corresponde ao trabalho feito por TSAKOIANNIS et al. (2015), ou seja, com a temperatura de anelamento de 58 °C (figura 2). Após padronização, a técnica PCR Multiplex foi aplicada nas demais amostras.

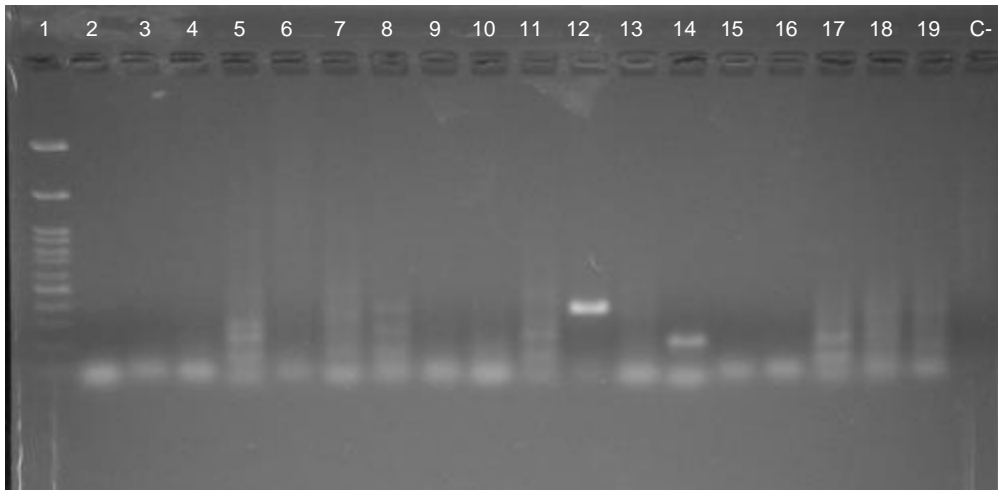


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 2% com temperatura de anelamento 58 °C. Produtos de amplificação por PCR em DNA de amostras de HPV. Poço 1: Peso molecular (PM); Poços 2-4: amostra 179 (blocos 1, 2 e 3, respectivamente); Poços 5-7: amostra 191 (blocos 1, 2 e 3, respectivamente) foi detectado o tipo 45 no bloco 1; Poços 8-10: amostra 297 (blocos 1, 2 e 3, respectivamente) foram detectados os tipos 16 e 11 no bloco 1; Poços 11-13: amostra 306 (blocos 1, 2 e 3, respectivamente) foi detectado o tipo 45 no bloco 1; Poços 14-16: amostra 310 (blocos 1, 2 e 3, respectivamente) foi detectado o tipo 45 no bloco 1; Poços 17-19: amostra 311 (blocos 1, 2 e 3, respectivamente) foram detectados os tipos 45 e 66 no bloco 1; Poço 20: controle negativo.

Dentre as 356 amostras positivas para HPV, a estratégia molecular PCR Multiplex conseguiu identificar os tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 58, 66 em 122 (34,3%) amostras, o que o caracteriza como um teste com alta especificidade. Após analisar a frequência de ocorrência de cada tipo de HPV (Figura 3), foi observada a prevalência do tipo 45 (11%). Trata-se de um resultado relevante, visto que esse tipo de HPV é considerado oncogênico (BRASIL, 2014). Quanto aos tipos de HPV 6 e 11 que são comumente encontrados nos condilomas genitais e possui um baixo potencial carcinogênico (BRASIL, 2014), os mesmos apresentaram baixa frequência nesse estudo 0,3 % e 2,2 %, respectivamente.

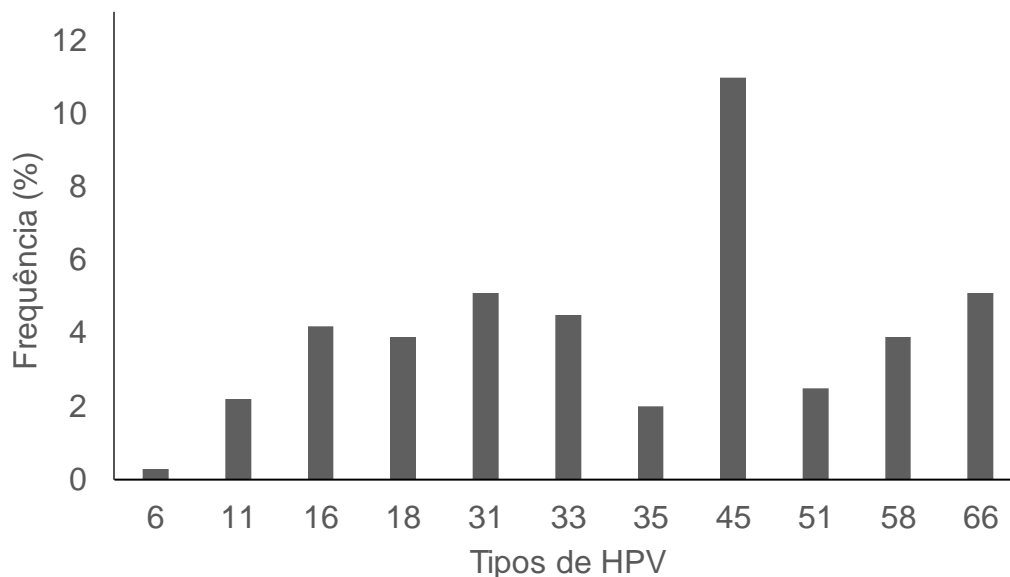


Figura 3. Frequência de tipos em HPV detectados em mulheres do estado de Sergipe (n = 356). Tipos 6 (0,3 %), 11 (2,2 %), 16 (4,2 %), 18 (3,9 %), 31 (5,1 %), 33 (4,5 %), 35 (2 %), 45 (11 %), 51 (2,5 %), 58 (3,9 %), 66 (5,1 %).

O Ministério da Saúde confirma que 70% dos casos de câncer do colo do útero são provocados pelos tipos de HPV 16 e 18 (BRASIL, 2014). Alguns estudos confirmam tais resultados, visto que demonstram a alta prevalência desses tipos de HPV (SOTLAR et al., 2004; TSAKOGIANNIS et al., 2015). No entanto, esses não utilizaram o *primer* do tipo 45, como realizado na presente pesquisa, sendo assim não é possível detectar a sua prevalência desse tipo de HPV.

Os tipos 31 e 66, também oncogênicos, foram os que apresentaram a segunda maior prevalência, 5,1 %. Os estudos desenvolvidos por SOTLAR et al. (2004) e SCHIFFMAN et al. (2015) corroboram com esse resultado ao detectar o tipo 31 como o segundo tipo mais prevalente. E no trabalho de TSAKOGIANNIS et al., (2015), o tipo 66 também foi considerado o segundo mais prevalente.

A técnica PCR Multiplex, por se tratar de uma metodologia de amplificação de DNA que utiliza mais de um primer por procedimento (ELNIFRO et al., 2000; SCHIFFMAN et al., 2015; SOTLAR et al., 2004; TSAKOGIANNIS et al., 2015), foi capaz de identificar mais de um tipo de HPV em 34 amostras (9,5%). Dessas, 31

amostras apresentaram coinfeções com 2 tipos do vírus e 3 amostras apresentaram 3 tipos virais (Tabela 2).

Tabela 2. Coinfeções de HPV em amostras da endocérvice de mulheres do estado de Sergipe.

Coinfeções de HPV	Amostras	Coinfeções de HPV	Amostras
11 e 66	12	16 e 33	151
51 e 58	37	11 e 33	208
	40		348
31 e 45	65	31 e 35	212
	155		
	64	6 e 31	213
33 e 45	77		
	193		
45 e 58	68	11 e 45	229
	88		296
	78		
45 e 66	120	33 e 66	315
	311		
	396		
	405		
	80	31, 45, e 51	176
18 e 66	379		
	380		
51 e 66	82	16, 35 e 45	249
	125		
16 e 66	84	31, 45 e 58	392
11 e 16	124		
	297		

Esse resultado mostra que a estratégia molecular supracitada apresenta sensibilidade, pois foi capaz de detectar mais de um tipo de HPV em diferentes amostras. Além disso, a técnica PCR Multiplex apresenta vantagens como, baixo custo e duração de tempo, quando comparada a outras, a exemplo do método convencional que investiga cada tipo de vírus em experimentos diferentes, demandando mais tempo e investimento financeiro (POTOCNIK et al., 2007; VAN BEURDEN et al., 1998). Estes aspectos dificultam a realização desses métodos em laboratórios mais simples.

Verificou-se que não foi possível identificar em todas as amostras coletadas (n = 356) o tipo de HPV. Esse resultado pode estar relacionado ao fato das demais pacientes apresentarem tipos de HPV que não foram investigados no presente estudo. Apesar disso, a técnica PCR Multiplex pode ser considerada eficiente, já que em apenas um procedimento foi possível testar a presença de 11 diferentes tipos do vírus.

8. Conclusões

A PCR Multiplex mostrou ser uma estratégia molecular sensível e específica para a detecção de Papilomavirus humano em pacientes que apresentam lesões cervicais. Dentre os 11 *primers* específicos que foram utilizados para detecção dos principais tipos de HPV, os tipos 45, 31 e 66 destacam-se como os mais prevalentes no estado de Sergipe.

9. Perspectivas

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, é possível traçar estratégias para diagnóstico mais preciso e precoce do HPV e com isso, otimizar o tratamento, diminuindo dessa forma o impacto para o paciente e o sistema de saúde.

10. Referências bibliográficas

BERNARD, H. U. et al. **Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments.** *Virology*, v. 401, n. 1, p. 70–79, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.002>>.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Guia Prático Sobre o HPV: Guia de perguntas e respostas para o profissional da saúde.** p. 1–44, 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/marco/07/guia-perguntas-repostas-MS-HPV-profissionais-saude2.pdf>>.

BURD, E. **Human papillomavirus and cervical cancer.** *Clin Microbiol Rev*, v. 16, n. 1, p. 1–17, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673607614160>>.

LIMA, S. F. et al. **Prevalence of human papillomavirus genotypes: comparison between three detection methods in patients of Pernambuco, Brazil.** *Revista brasileira de ginecologia e obstetrícia : revista da Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 33, n. 10, p. 315–320, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22231166>>.

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

ELNIFRO, E. M. et al. **Multiplex PCR : Optimization and Application in Diagnostic Virology** *Multiplex PCR : Optimization and Application in Diagnostic Virology.* *Clinical microbiology reviews*, v. 13, n. 4, p. 559–570, 2000.

LIN, C. Y. **Evaluation of using composite HPV genotyping assay results to monitor human papillomavirus infection burden through simulation.** *BMC infectious diseases*, v. 15, p. 1–12, 2015.

POTOCNIK, M. et al. **Distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes in genital warts from males in Slovenia.** *Acta dermatovenerologica Alpina, Pannonica, et Adriatica*, v. 16, n. 3, p. 91–6, 98, 2007. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/17994168>>.

RITARI, J. et al. **Detection of human papillomaviruses by polymerase chain reaction and ligation reaction on universal microarray.** *PLoS ONE*, v. 7, n. 3, p. 1–8, 2012.

- ROMERO-PASTRANA, F.. **Detection and Typing of Human Papilloma Virus by Multiplex PCR with Type-Specific Primers**. ISRN Microbiology, v. 2012, p. 1–5, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/186915/>>.
- SCHIFFMAN, M. et al. **A study of genotyping for management of human papillomavirus-positive, cytology-negative cervical screening results**. Journal of Clinical Microbiology, v. 53, n. 1, p. 52–59, 2015.
- SOTLAR, K. et al. **Detection and Typing of Human Papillomavirus by E6 Nested Multiplex PCR**. Society, v. 42, n. 7, p. 3176–3184, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15243079>.
- TSAKOGIANNIS, D. et al. **Multiplex PCR assay for the rapid identification of human papillomavirus genotypes 16, 18, 45, 35, 66, 33, 51, 58, and 31 in clinical samples**. Archives of Virology, v. 160, n. 1, p. 207–214, 2015.
- UNB, Calouro. **Guia do HPV**. p. 1–42, 2013.
- UNTERGASSER, A. et al. **Primer3-new capabilities and interfaces**. Nucleic Acids Research, v. 40, n. 15, p. 1–12, 2012.
- VAN BEURDEN, M. et al. **Human papillomavirus DNA in multicentric vulvar intraepithelial neoplasia**. International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists, v. 17, n. 1, p. 12–16, 1998. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/9475186>>.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The Global Burden of Disease: 2004 update**. 2004 Update, p. 1–146, 2008. Disponível em: <http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/index.html>.

11. Atividades realizadas

- Além de todas as atividades previstas no plano de trabalho, foram realizadas leituras de materiais bibliográficos acerca de outros estudos que relatavam experimentos com o mesmo tipo de estratégia molecular, detecção do vírus Papilomavirus Humano (HPV) em lesões cervicais utilizando a técnica de multiplex da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com o objetivo de servir como base para nossos experimentos;
- Foram feitas reuniões científicas com o orientador para análise dos resultados obtidos após cada experimento, objetivando traçar as melhores estratégias para padronização do PCR Multiplex.

12. Outras atividades

- Participação e apresentação de trabalho no III International Symposium of Ecology and Evolution (III EcoEvol) e XIII Congresso de Ecologia do Brasil (XIII CEB), realizado de 08 a 12 de Outubro de 2017 na Universidade Federal de Viçosa, campus Viçosa/MG;
- Apresentação de trabalho durante o 27º EIC - Encontro de Iniciação Científica da Universidade Federal de Sergipe realizado nos dias 20 a 24 de Novembro de 2017;
- Participação no minicurso sobre Gerenciamento de referências bibliográficas da atividade de extensão IV SEMAC - MINICURSOS PIBIC 2017, realizada no período de 20 a 24 de Novembro de 2017;
- Participação como ministrante do minicurso “CSI: ferramentas para desvendar um crime” da Jornada Esportiva Cultural do Codap – JECCA do Colégio de Aplicação da UFS, realizado em 06 de Fevereiro de 2018 na Universidade Federal de Sergipe, campus São Cristóvão/SE;
- Participação do Seminário de Estudo de Caso e Perspectivas Culturais, realizado nos dias de 6 e 7 de fevereiro de 2018 na Universidade Federal de Sergipe, campus São Cristóvão/SE;

- Participação como monitora da exposição “Biologia-UFS 45 anos”, realizado de 01 a 04 de Março de 2018 no Shopping Riomar/SE, organizado pelo Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe, campus São Cristóvão/SE;
- Participação do curso “Estatística Ferramental Para Biólogos (Software R)”, realizado no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe, entre os dias 12 de março a 16 de março de 2018, com carga horária total de 20 horas;
- Participação como ministrante do “V Curso de Atualização em Bioinformática”, realizado de 19 a 23 de Março de 2018 na Universidade Federal de Sergipe, campus São Cristóvão/SE;
- Participação do seminário “Abordagens para a integração Ecofisiologia-macroecologia, realizado no dia 20 de junho de 2018 na Universidade Federal de Sergipe, campus São Cristóvão/SE.