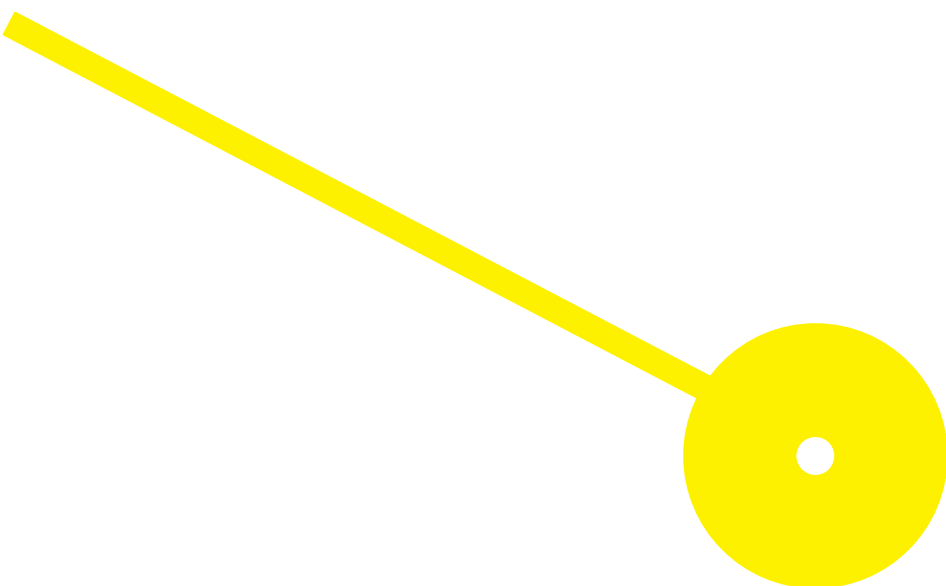




Genotipagem do HPV em doentes com suspeita de cancro da próstata

Beatriz Monteiro Pinheiro

10/2024





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



Genotipagem do HPV em doentes com suspeita de cancro da próstata

Autor

Beatriz Monteiro Pinheiro

Orientadores

Prof. Luís Augusto Cirnes Cardoso, Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (Ipatimup); Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto (ESS|P.PORTO)

Prof. Doutora Regina Augusta Alves Pereira da Silva, ESS|P.PORTO

Relatório de Estágio apresentado para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Técnicas Laboratoriais em Biopatologia** – Área de Especialização em **Patologia Molecular** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

A realização deste relatório de estágio de mestrado foi um desafio que só se tornou possível graças ao apoio incondicional de várias pessoas, às quais gostaria de expressar o meu mais profundo e sincero agradecimento.

Em primeiro lugar, quero expressar a minha gratidão a toda a equipa do Ipatimup, em especial à Jéssica, à Luísa, à Patrícia e à Maria João pela confiança, apoio e disponibilidade constante ao longo deste percurso. Agradeço igualmente à Paula, à Tânia e à Susete, do laboratório do CCGen, pela simpatia e por toda a ajuda prestada na realização das tarefas ao longo do estágio, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço profundamente ao meu orientador, Professor Luís Cirnes, e aos meus supervisores, Mestre Ana Mafalda Rocha e Robertus Mensink pela sua orientação excecional, pela paciência em cada etapa deste processo, pela amizade e por todo o apoio ao longo do estágio. O vosso compromisso e dedicação foram fundamentais para a concretização deste trabalho.

Um especial agradecimento à Dra. Carmen Lisboa e à Ângela Fernandes pelo fornecimento dos dados que serviram de base para este estudo, sem os quais a sua concretização não teria sido possível.

À Professora Regina, manifesto a minha mais sincera gratidão pelo apoio académico e pela motivação que me transmitiu ao longo de todo este percurso.

A minha família, especialmente o meu namorado, pais e irmã, merece um agradecimento especial, por todo o amor, apoio, incentivo e paciência que sempre me ofereceram. Às minhas amigas, em particular à Sónia, à Ana e à Marta, o vosso carinho e compreensão foram essenciais em momentos chave.

Finalmente, não poderia deixar de agradecer às minhas colegas de curso, especialmente à Sara e à Raquel. O vosso incentivo e apoio contínuos foram fundamentais para que eu pudesse alcançar este objetivo.

A todos, o meu mais sincero e profundo agradecimento!

Resumo

O cancro da próstata (CaP) é um importante problema de saúde pública, sendo em Portugal o tipo de cancro mais comum nos homens e a segunda principal causa de morte por cancro. A infeção persistente e a longo prazo pelo vírus do papiloma humano (HPV) de alto risco, aumenta o risco para desenvolvimento de cancro e alguns estudos associam-na ao desenvolvimento do CaP. O principal objetivo do presente estudo foi estudar uma possível associação entre infeção pelo HPV e o CaP. Primeiramente foi implementada e validada uma nova metodologia para a deteção do HPV baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real com sondas conjugadas com fluorocromos da Mospire©. Posteriormente esta metodologia foi usada para a deteção do HPV em 188 amostras de doentes com suspeita de CaP. Amostras com resultado inconclusivo ou inválido foram submetidas a PCR convencional seguida de sequenciação de Sanger. O HPV foi detetado apenas em 15 das 186 amostras (7,4%), sendo 10 (7%) dessas amostras com CaP (n=142) e 5 (11,4%) dessas amostras sem CaP (n=44). Será necessário aumentar a amostragem, assim como expandir este estudo para outros tipos de lesões da próstata para averiguar impacto da infeção por HPV no CaP.

Palavras-chave: Cancro da Próstata, HPV, DNA, PCR em Tempo Real, Diagnóstico Molecular

Abstract

Prostate cancer (PCa) is an important public health problem, being in Portugal the most common type of cancer in men and the second leading cause of death from cancer. Persistent and long-term infection with the high-risk human papillomavirus (HPV) increases the risk of developing cancer and some studies associate it with the development of PCa. The main objective of the present study was to study a possible association between HPV infection and PCa. Firstly, a new methodology for HPV detection based on real-time polymerase chain reaction (PCR) with fluorochrome-conjugated probes from Mospire© was implemented and validated. Subsequently, this methodology was used to detect HPV in 188 samples from patients suspected of having PCa. Samples with inconclusive or invalid results were subjected to conventional PCR followed by Sanger sequencing. HPV was detected in only 15 of the 186 samples (7.4%), with 10 (7%) of these samples with PCa (n=142) and 5 (11.4%) of these samples without PCa (n=44). It will be necessary to increase sampling, as well as expand this study to other types of prostate lesions to investigate the impact of HPV infection on PCa.

Keywords: Prostate Cancer, HPV, DNA, Real-Time PCR, Molecular Diagnosis

Índice

1.	Introdução	1
1.1.	O Vírus do Papiloma Humano (HPV)	2
1.1.1.	Estrutura do HPV	2
1.1.2.	Infeção pelo HPV	4
1.1.3.	Fatores de risco para infeção e carcinogénese	7
1.2.	Dados epidemiológicos sobre o cancro	7
1.2.1.	Incidência do cancro da próstata	8
1.2.2.	Patologias prostáticas mais comuns	9
1.3.	Métodos moleculares para a deteção do HPV	10
1.3.1.	Captura Híbrida	10
1.3.2.	PCR	11
1.3.3.	PCR-RFLP	12
1.3.4.	PCR em tempo real	12
1.3.5.	Sequenciação de Sanger	13
1.3.6.	NGS	14
1.4.	Objetivos	15
2.	Materiais e Métodos	16
2.1.	Amostras	16
2.2.	Extração de DNA	16
2.3.	Quantificação e avaliação da qualidade de DNA	17
2.4.	Deteção do DNA do HPV por PCR em tempo real	18
2.5.	Amplificação por PCR convencional	20
2.6.	Eletroforese	22
2.7.	Sequenciação de Sanger	22
2.8.	Análise estatística	24
3.	Resultados	26
3.1.	Extração e quantificação do DNA do HPV	26
3.2.	Implementação e validação do kit de amplificação de DNA do HPV baseado em PCR em tempo real	26
3.3.	Pesquisa do HPV em tecido prostático por PCR em tempo real	29

3.3.1. Análise das amostras com resultados inconclusivos e inválidos.....	30
3.4. Estudo da associação da infecção por HPV e CaP	36
4. Discussão.....	40
4.1. Extração e quantificação do DNA do HPV.....	40
4.2. Implementação e validação do kit de amplificação de DNA do HPV baseado em PCR em tempo real	41
4.3. Pesquisa do HPV em tecidos prostático por PCR em tempo real	42
4.3.1. Análise das amostras com resultados inconclusivos e inválidos.....	43
4.4. Estudo da associação da infecção por HPV e CaP	46
5. Conclusão	50
Referências Bibliográficas.....	51
Anexos.....	60

Índice de Abreviaturas

A

A: Adenina

ATP: Adenosine Triphosphate (Adenosina Trifosfato)

B

bp: Base Pair (Par de Bases)

C

C: Citosina

CaP: Cancro da Próstata

CHUSJ: Centro Hospitalar Universitário São João

Ct: Cycle Threshold (Ciclo Limite)

D

DNA: Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

ddNTPs: Dideoxynucleotides Triphosphate (Didesoxirribonucleótidos Trifosfato)

dNTPs: Deoxynucleotides Triphosphate (Desoxirribonucleótidos Trifosfato)

E

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor (Recetor do Fator de Crescimento Epidérmico)

EV: Epidermodisplasia Verruciforme

J

JEC: Junção Escamocolunar Cervical

L

LCR: Long Control Region (Região Longa de Controlo)

N

NCR: Non Coding Region (Região Não Codificante)

NGS: Next-Generation Sequencing (Sequenciação de Nova Geração)

NTC: No Template Control (Controlo Sem DNA)

O

OMS: Organização Mundial da Saúde

ORF: Open Reading Frame (Quadro de Leitura Aberta)

P

PC: Positive Control (Controlo Positivo)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

PIN: Prostatic Intraepithelial Neoplasia (Neoplasia Intraepitelial Prostática)

pRB: Retinoblastoma Protein (Proteína do Retinoblastoma)

PSA: Prostate Specific Antigen (Antigénio Específico da Próstata)

F

FFPE: Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded (Fixado em Formol e Incluído em Parafina)

G

G: Guanina

H

HPV: Human Papillomavirus (Vírus do Papiloma Humano)

I

IARC: International Agency for Research on Cancer (Agência Internacional de Investigação do Cancro)

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses (Comité Internacional de Taxonomia de Vírus)

R

RFLP: Restriction Fragment Length

Polymorphism (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição)

RNA: Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)

rpm: Rotações por Minuto

S

SAP: Shrimp Alkaline Phosphatase (Enzima Fosfatase Alcalina)

T

T: Timina

T_m: Temperatura de Melting

U

UDG: Uracil DNA Glycosylase (Uracil DNA Glicosilase)

URR: Upstream Regulatory Region (Região Reguladora a Montante)

Índice de Tabelas

Tabela 1- Genótipos de HPV identificados em cada poço de uma dada tira presente no kit de amplificação de DNA do HPV da Mospire®	18
Tabela 2- Sequências dos pares de <i>primers</i> usados para a amplificação do HPV pelo método da PCR convencional	21
Tabela 3- Reagentes do kit QIAGEN® Multiplex PCR utilizados para a amplificação por PCR do DNA do HPV.....	21
Tabela 4- Condições de PCR para a amplificação do DNA do HPV utilizando o kit QIAGEN® Multiplex PCR.....	22
Tabela 5- Reagentes do kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing utilizados para a preparação da Sequenciação de Sanger	23
Tabela 6- Condições de PCR para a Sequenciação de Sanger utilizando o kit QIAGEN® Multiplex PCR.....	23
Tabela 7- Genótipos de HPV identificados pelo teste CLART® HPV 4 e pelo novo kit de amplificação de DNA do HPV da Mospire®.....	28
Tabela 8- Relação entre o CaP e as variáveis: idade; resultado genotipagem; tipo de infecção e genótipo detetado.....	38

Índice de Figuras

Figura 1- O genoma do HPV.....	2
Figura 2- O ciclo de vida do HPV e as proteínas virais envolvidas em cada fase.....	6
Figura 3- Distribuição da incidência de cancro por tipo em Portugal, referente ao ano de 2022...8	
Figura 4- Fluxograma dos métodos aplicados no presente estudo nos dois grupos de amostras..	25
Figura 5- Curvas de amplificação de um caso negativo para a presença de DNA do HPV analisadas com a aplicação "Design and Analysis New qPCR" (Cloud, Thermo Fisher).	27
Figura 6- Curvas de amplificação de um caso positivo para um genótipo do HPV analisadas com a aplicação "Design and Analysis New qPCR" (Cloud, Thermo Fisher).	27
Figura 7- Curvas de amplificação de um caso positivo para três genótipos do HPV analisadas com a aplicação "Design and Analysis New qPCR" (Cloud- Thermo Fisher).	28
Figura 8- Curvas de amplificação de um caso com resultado inconclusivo para a presença de DNA do HPV, analisadas com <i>software</i> CFX Maestro (v 2.2) (Bio-Rad)..	29
Figura 9- Curvas de amplificação de um caso com resultado inválido para a presença de DNA do HPV, analisadas com a aplicação "Design and Analysis New qPCR" (Cloud, Thermo Fisher).	30
Figura 10- Eletroforese em gel de agarose a 2% demonstrando os resultados do teste de gradiente para os <i>primers</i> GP5/GP6 a fim de identificar a temperatura de <i>annealing</i> ideal.	31
Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose a 2% demonstrando a influência da diminuição da quantidade dos <i>primers</i> GP5/GP6 na amplificação do DNA do HPV por PCR convencional. A).	32
Figura 12- Eletroforese em gel de agarose a 2% demonstrando a influência da diminuição da quantidade dos <i>primers</i> MY09/MY11 na amplificação do DNA do HPV por PCR convencional.	33
Figura 13- Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de amplificação de amostras previamente classificadas como inconclusivas e inválidas pelo método da PCR em tempo real..	34
Figura 14- Eletroferograma resultante da sequenciação de Sanger analisado com o <i>software</i> Sequencing Analysis 7 v7.1.....	35
Figura 15- Comparação de resultados obtidos por uma tecnologia (PCR em tempo real) em relação ao uso combinado de duas tecnologias (PCR em tempo real e sequenciação de Sanger).	36

Figura 16- Relação entre a detecção de HPV em tecido prostático por grupos etários em indivíduos com e sem CaP.....39

1. Introdução

O estágio curricular realizado no Ipatimup Diagnósticos e na plataforma científica de genómica do Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (I3S), entre setembro de 2023 e janeiro de 2024, teve como objetivo a integração dos conhecimentos adquiridos ao longo do mestrado em técnicas laboratoriais em biopatologia- ramo de patologia molecular da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto, na prática clínico-laboratorial, assim como o desenvolvimento e aquisição de competências técnico-laboratoriais e uma melhor compreensão do funcionamento do ambiente laboratorial.

O Ipatimup Diagnósticos é uma instituição de referência em diagnóstico e pesquisa nas áreas de patologia e biomedicina, mais especificamente em oncologia e patologia molecular, utilizando métodos de diagnóstico avançados que contribuem significativamente para a saúde pública e para o avanço do conhecimento científico. A plataforma científica de genómica, parte do I3S, é uma unidade de referência que se destaca pela utilização de novas tecnologias avançadas de sequenciação de ácido desoxirribonucleico (do inglês "Deoxyribonucleic Acid" - DNA) e de ácido ribonucleico (do inglês "Ribonucleic Acid" - RNA) e reação em cadeia da polimerase (do inglês "Polymerase Chain Reaction" - PCR) em tempo real, fornecendo orientação em desenvolvimento de protocolos e análise de dados.

Em colaboração estas instituições formam um ambiente adequado para a pesquisa e inovação em saúde, nomeadamente o diagnóstico de infeções virais, como da infeção pelo vírus do papiloma humano (do inglês "Human Papillomavirus" - HPV) que é o foco do relatório de estágio. Durante o período de estágio participei em diversas atividades de rotina laboratoriais, nomeadamente em técnicas de sequenciação de nova geração (do inglês "Next-Generation Sequencing" - NGS), sequenciação de Sanger e análise dos dados, PCR em tempo real, PCR convencional, extração automatizada de DNA, eletroforese digital, quantificação de DNA/RNA, purificação DNA e análise de fragmentos (linhagens celulares). A orientação do professor Luís Cirnes e o apoio dos supervisores Mestre Ana Mafalda Rocha e Robertus Mensink foram essenciais para as minhas aprendizagens e para o desenvolvimento profissional e pessoal.

O estágio realizado além de reforçar a minha formação em patologia molecular, serviu, de igual forma, de base para o presente relatório que se foca na genotipagem do HPV em tecido prostático de pacientes com suspeita de cancro da próstata (CaP) e explorar uma possível associação entre a infeção pelo HPV e o desenvolvimento de CaP.

1.1. O Vírus do Papiloma Humano (HPV)

1.1.1. Estrutura do HPV

O HPV, pertencente à família *Papillomaviridae*, apresenta-se sob forma de partícula viral icosaédrica sem invólucro com um diâmetro entre 52 a 55 nm. O genoma do HPV é circular (Figura 1) de cadeia dupla com cerca de 8000 pares de bases (do inglês “base pair”- bp) e é composto por DNA.(1,2) Esta molécula de cadeia dupla circular pode ser dividida em três regiões de acordo com as funções no ciclo de vida viral: região precoce (E- *Early*); região tardia (L- *Late*); e região longa de controlo (do inglês “Long Control Region”- LCR), também designada de região reguladora a montante (do inglês “Upstream Regulatory Region” - URR) ou região não codificante (do inglês “Non Coding Region”- NCR). A região precoce ocupa mais de 50% do genoma viral e contém seis quadros de leitura aberta (do inglês “Open Reading Frame”- ORFs), responsáveis pela codificação de proteínas envolvidas no ciclo de vida viral (E1, E2, E4, E5, E6 e E7).(3) A região tardia é responsável por quase 40% de todo o genoma e contém duas ORFs, responsáveis por codificar as duas proteínas estruturais a L1 e a L2. (4) A LCR, que constitui 10% do genoma, contém os locais de ligação de proteínas como E1 e E2, além de fatores de transcrição celular (1), sendo crucial para a replicação viral.(5-7) As regiões são separadas por locais de poliadenilação (6), e embora o genoma viral codifique várias proteínas, apenas E1, E2, L1 e L2 são imprescindíveis para a replicação e disseminação do vírus em todos os HPVs conhecidos.(8)

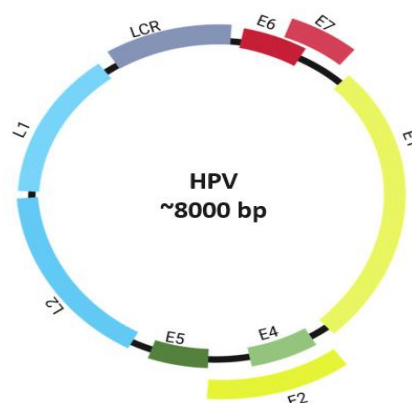


Figura 1–O genoma do HPV. Molécula de DNA circular de dupla cadeia com aproximadamente 8000 bp, onde se encontram as três regiões principais: a região precoce (E - *Early*), que codifica seis proteínas virais; a região tardia (L - *Late*), que codifica as proteínas estruturais L1 e L2; e a região de controlo longa (LCR), que regula a replicação e a transcrição. (Adaptado de:(21))

Atualmente são conhecidos mais de 200 genótipos de HPV que estão agrupados em cinco gêneros principais: *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* e *Nupapillomavirus*.⁽⁷⁾ O gene L1 é amplamente utilizado na classificação dos HPVs por ser altamente conservado entre os diferentes genótipos. HPVs com mais de 60% de similaridade na sequência de nucleótidos deste gene pertencem ao mesmo gênero. Dentro de um gênero, os que compartilham 60–70% de similaridade são classificados como da mesma espécie. Um novo genótipo de HPV, comumente designado por “tipo”, tem entre 71–89% de similaridade com qualquer outro genótipo de HPV.⁽⁹⁾ HPVs com 90–98% de similaridade são classificados como subtipos e aqueles com mais de 98% de similaridade são classificados como variantes.^(5,10,11) A nomenclatura do vírus até ao nível espécie (ordem, família, gênero e espécie) é regulamentada pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (do inglês “International Committee on Taxonomy of Viruses” – ICTV). Abaixo desse nível, a nomenclatura é da responsabilidade do Centro Internacional de Referência do HPV. Para atribuir um número a um novo genótipo, este centro exige a sequenciação completa do genoma, bem como a clonagem, para garantir a viabilidade dos clones e confirmar a precisão da sequência de DNA antes da sua atribuição.^(12,13)

Dos cinco gêneros do HPV, quatro (*Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* e *Nupapillomavirus*), infetam exclusivamente o epitélio estratificado cutâneo, enquanto o gênero *Alphapapillomavirus* infeta tanto o epitélio estratificado cutâneo como o mucoso.⁽¹⁴⁾ De acordo com a gravidade das lesões, o HPV pode ser classificado em alto, médio e baixo risco. Segundo os resultados da investigação da Agência Internacional de Investigação do Cancro (do inglês “International Agency for Research on Cancer” – IARC), apenas os do gênero *Alphapapillomavirus* são classificados com risco (alto, médio e baixo) em relação ao desenvolvimento de cancro: os genótipos HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 são classificados como de alto risco, os genótipos HPV 26, 53, 66, 73 e 82 são classificados como de médio e os genótipos HPV 6, 11, 42, 43, 44 e 81 são classificados como de baixo risco.^(8,14) Dentro dos genótipos de alto risco, os HPVs 16 e 18 são considerados os mais importantes devido à sua forte associação com o desenvolvimento de cancro do colo do útero e outros tipos de cancro anogenital. Os genótipos de médio risco são classificados com base na proximidade filogenética aos genótipos dos HPVs de alto risco ⁽¹⁴⁾, mas ainda não está esclarecido o risco de causar alguma alteração maligna na célula. Os genótipos de baixo risco não causam cancro, mas provocam verrugas genitais ou condilomas acuminados.^(8,14,15) Segundo a IARC, foram

identificados pelo menos dois genótipos de HPV, do género *Betapapillomavirus* em indivíduos com a doença genética epidermodisplasia verruciforme (EV), que podem ser potencialmente cancerígenos. Contudo, não há evidências suficientes para que esses vírus sejam classificados como de alto risco em indivíduos normais.(14)

1.1.2. Infecção pelo HPV

A infecção pelo HPV é altamente prevalente, existindo cerca de 40 genótipos de HPV capazes de infetar a região genital. Está descrito na literatura, que cerca de 80% da população sexualmente ativa contrai uma infecção genital pelo HPV em algum momento da sua vida (1,16), embora a transmissão não sexual também seja uma possibilidade.(8) De salientar que a maioria destas infecções cervicais pelo HPV é resolvida pelo sistema imunológico do hospedeiro em um a dois anos, sendo, frequentemente, infecções assintomáticas.(8)

O HPV não dispõe de mecanismos de auto-replicação e, através da infecção das células indiferenciadas da camada basal do epitélio escamoso cutâneo ou da mucosa com capacidade de divisão celular é que este consegue propagar. As camadas do epitélio mais externas, que são mais diferenciadas, não têm capacidade de divisão celular.(7) Para o vírus ter acesso à camada basal, é necessário o epitélio apresentar microlesões, que podem ocorrer durante relações sexuais. Alternativamente, o HPV também consegue penetrar pela junção escamocolunar cervical (JEC), presente no colo do útero (7), onde as células da camada basal estão mais expostas e não havendo necessidade de microlesões para a infecção ocorrer.(1,6) A infecção pelo HPV inicia-se quando com a ligação do vírus a recetores específicos nas células epiteliais, facilitando a sua entrada via endocitose.(17) Após a internalização, o HPV é transportado em endossomas que, ao se fundirem com lisossomas, criam um ambiente ácido que provoca a desagregação da cápsula proteica (proteína L1). O DNA viral é então libertado e transportado para o núcleo da célula pela proteína L2, que interage com microtúbulos durante a mitose, facilitando a entrada do DNA no núcleo após a desagregação do invólucro nuclear.(7,18) Dentro do núcleo, o HPV utiliza a maquinaria de replicação da célula hospedeira para iniciar o seu ciclo de vida(7,19), que se divide em três fases principais: **estabelecimento**, **manutenção** e **amplificação** (Figura 2) com base no comportamento do vírus em relação ao ciclo celular da célula hospedeira.

Na fase de **estabelecimento**, após a entrada no núcleo da célula hospedeira, ocorre a transcrição viral e a amplificação de um número reduzido de cópias do genoma viral, mediada pelas proteínas virais E1 e E2.(8) A E1 atua como helicase, desenrolando o DNA, enquanto a E2

recruta as proteínas necessárias para a replicação, incluindo DNA polimerases.(20) Além disso, a E2 liga-se a promotores no LCR, inibindo a transcrição das proteínas oncogénicas E6 e E7, o que ajuda a manter o número de cópias viral baixo e previne alterações celulares descontroladas.(21) No final desta fase, cada célula hospedeira pode conter entre 50 a 100 cópias do genoma viral.(16)

A **fase de manutenção** caracteriza-se pela preservação do número de genomas virais, estabelecendo uma infeção persistente. Nesta fase o vírus encontra-se no estado episomal, ou seja, o DNA viral permanece separado do DNA do hospedeiro, replicando-se de forma independente. (7) As proteínas virais são expressas em níveis muito baixos nas células indiferenciadas da camada basal, funcionando como um mecanismo de escape à resposta imune.(22) A expressão das proteínas E6, E7, E1 e E2 é fundamental, uma vez que E1 e E2 são responsáveis por iniciar a replicação do DNA viral, enquanto E6 e E7 modificam os reguladores do ciclo celular, garantindo a continuidade e eficiência da replicação viral. A proteína E2, ao ligar-se ao LCR, inibe a transcrição de E6 e E7, evitando proliferação descontrolada e promovendo um estado latente, com um número estável de cópias do genoma viral.(21) Durante esta fase “latente”, os genomas virais podem ser mantidos nas células da camada basal durante anos ou décadas após a infeção inicial, o que pode levar à formação de lesões pré-malignas.(13,22,23)

A **fase de amplificação** marca uma transição crucial na infeção por HPV, permitindo a produção intensificada de genomas virais e a formação de partículas virais.(13) As células infetadas diferenciam-se e deslocam-se em direção à superfície do epitélio. Embora as células diferenciadas normalmente não consigam sintetizar DNA viral, as proteínas E6 e E7 reativam o ciclo celular, promovendo a entrada na fase S e a replicação do genoma viral, com o auxílio das proteínas de replicação E1 e E2. As proteínas E4 e E5 desempenham papéis significativos: a E4 contribui para a libertação do vírus nas camadas epiteliais superiores (24), enquanto a E5 regula a sinalização celular, promovendo a proliferação induzida pelo recetor do fator de crescimento epidérmico (do inglês “Epidermal Growth Factor Receptor” – EGFR) e prevenindo a autofagia.(21) A sinalização de EGFR é crucial para a síntese não programada de DNA e para a progressão do ciclo celular, indicando que a função da E5 pode ser relevante tanto para o ciclo de vida do vírus quanto para a formação de tumores. (6)

As proteínas E6 e E7 desempenham um papel crucial na modificação do ambiente celular facilitando a amplificação do genoma viral em células diferenciadas. A proteína E7, por exemplo, inativa a proteína retinoblastoma (pRB), que regula a transição do ciclo celular de G1 para S, permitindo que as células infetadas avancem no ciclo celular e produzam DNA viral. (24) A E6, por

sua vez, degrada a p53, uma proteína que regula o ciclo celular e a apoptose, levando a uma proliferação descontrolada. A alta expressão das proteínas E6 e E7 resulta num aumento significativo do número de cópias do vírus por célula. (22)

O ciclo de vida do HPV finaliza com a expressão das proteínas L1 e L2, essenciais para a formação da cápside viral. A proteína L2 é recrutada para as regiões de replicação antes da expressão de L1, o que é crucial para a formação do vírus. A maturação viral ocorre nas células superficiais do epitélio, onde o ambiente intracelular muda de redutor para oxidante, facilitando a libertação do vírus. (25) Esse processo resulta numa cápside mais estável e resistente à digestão por proteases. (26) A acumulação da proteína E4, por sua vez, leva à libertação de partículas virais na superfície do epitélio. Durante o ciclo de vida do HPV, o DNA viral pode integrar-se no DNA do hospedeiro, especialmente durante a fase de manutenção. Essa integração é frequentemente observada em lesões pré-malignas e malignas. É importante notar que essa integração não faz parte do ciclo de vida do vírus, mas representa um "beco sem saída" que pode ter consequências graves para a saúde do hospedeiro. (7)

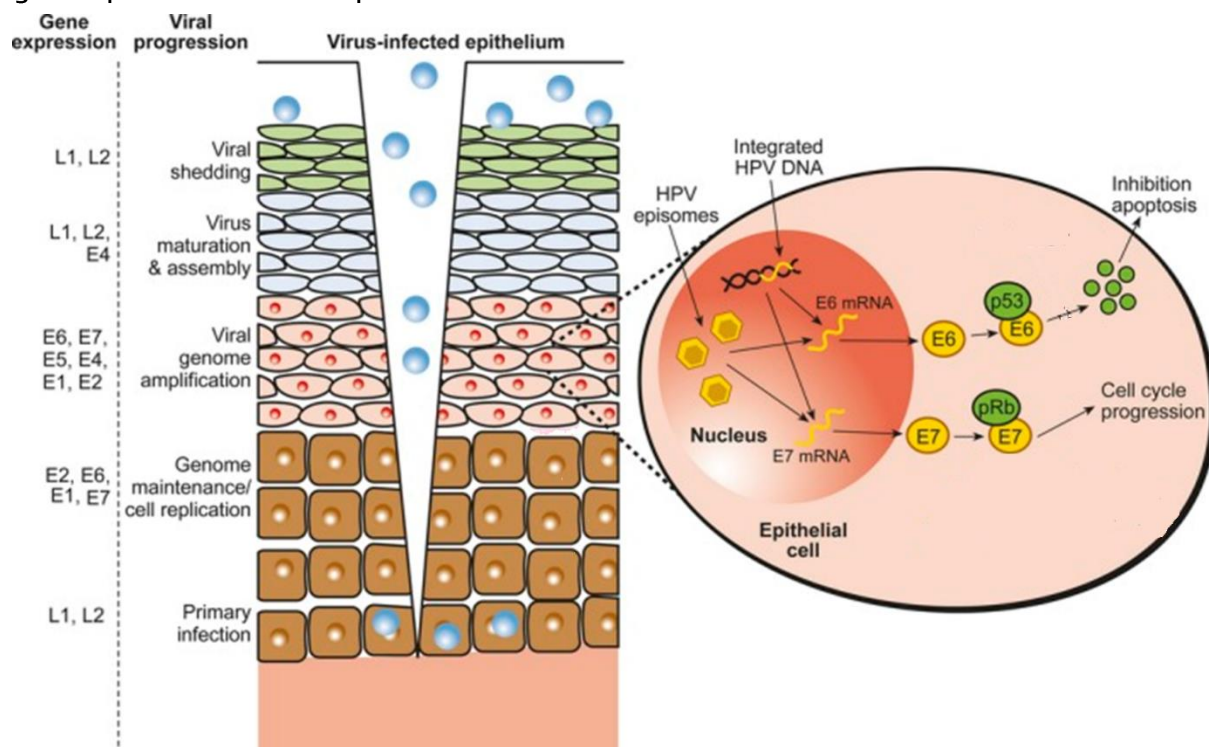


Figura 2– O ciclo de vida do HPV e as proteínas virais envolvidas em cada fase. O HPV infeta as células da camada basal do epitélio após microlesões. Na fase de estabelecimento, o vírus entra no núcleo, com E1 atuando como helicase e E2 regulando a transcrição de E6 e E7. Durante a fase de manutenção, E2 inibe a expressão de E6 e E7, evitando a proliferação descontrolada. Na fase de amplificação, as proteínas E6 e E7 reativam o ciclo celular ao interagir com pRb e p53, promovendo a replicação viral, enquanto E4 contribui para a libertação do vírus e E5 regula a sinalização celular. As proteínas L1 e L2 são essenciais para a formação da cápside viral. Em algumas situações, o DNA viral pode integrar-se no genoma do hospedeiro, aumentando o risco de cancro. (Adaptado de:(13))

1.1.3. Fatores de risco para infecção e carcinogénese

Muitos génotipos de HPV podem ser considerados comensais, mas a infecção persistente por HPV de alto risco aumenta significativamente o risco de cancro. A integração viral no genoma do hospedeiro é uma consequência crítica desta infecção, levando à desregulação da expressão das proteínas virais.(6,24) A repressão da expressão da proteína E2 resulta no aumento da expressão das proteínas E6 e E7, que estão envolvidas em mecanismos que levam à degradação/inibição de proteínas supressoras tumorais, com consequente crescimento celular descontrolado. Revisão de literatura aponta que as proteínas E6 e E7 dos HPVs de alto risco possuem uma maior afinidade pelos seus alvos celulares comparativamente às expressas em HPVs de baixo risco, o que explica, em parte, a capacidade dos HPVs de alto risco estarem envolvidos na carcinogénese.(7)

Alguns estudos (27–29) também demonstraram que a atividade sexual é um fator de risco para infeções por HPV de alto risco. O risco aumenta com a presença de múltiplos parceiros sexuais ou de um parceiro ter tido muitos parceiros anteriores. Além disso, a atividade sexual precoce e um histórico de outras infeções sexualmente transmissíveis também elevam a vulnerabilidade à infecção pelo HPV.(30)

Embora o HPV esteja frequentemente associado ao cancro do colo do útero, também é uma preocupação significativa para a saúde dos homens.(31) Na realidade um estudo relata uma maior prevalência de infeções orais e genitais por HPV de alto risco em homens comparativamente às mulheres.(32) Portanto, medidas preventivas contra infecção pelo HPV, tanto em homens quanto em mulheres, incluem educação sobre práticas sexuais seguras, adiamento do início da atividade sexual e promoção do uso de preservativos.(30)

1.2. Dados epidemiológicos sobre o cancro

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a IARC, o cancro representa uma das principais causas de morte em todo o mundo, tendo sido responsável por quase 10 milhões de mortes em 2020.(33) Em Portugal, o cancro é a segunda principal causa de morte, apesar de ter uma das menores taxas de incidência de cancro na União Europeia, há ainda muito a ser melhorado.(34) De acordo com dados da GLOBOCAN 2022(Figura 3), o cancro colorretal foi o mais comum em Portugal, representando 15,2% dos casos diagnosticados, seguido pelo cancro da mama com 12,9% e o CaP com 10,8%. Estes dados sublinham a necessidade de reforçar as

estratégias de prevenção, diagnóstico precoce e tratamento para reduzir a carga desta doença na população portuguesa.

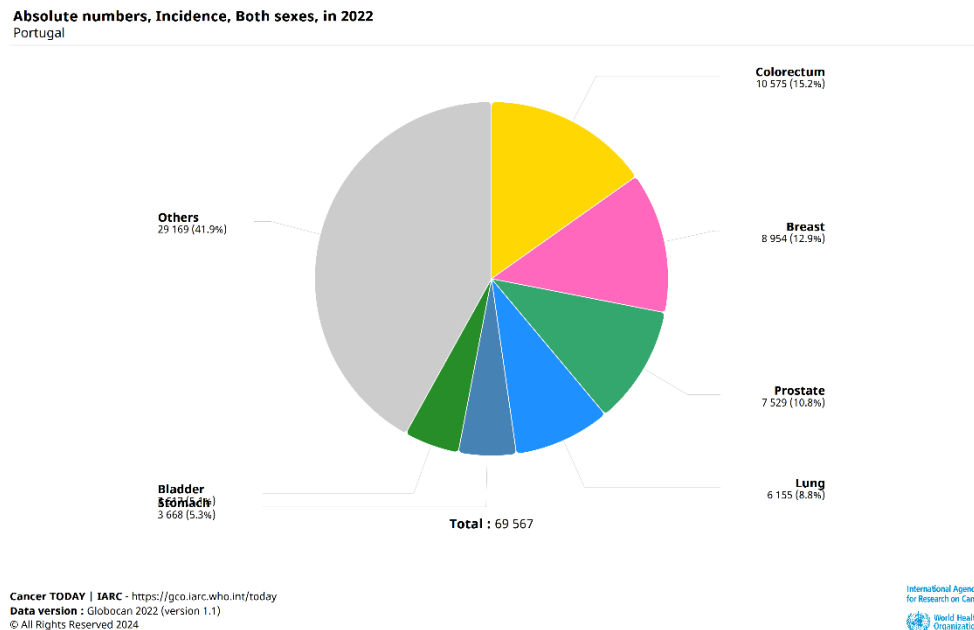


Figura 3– Distribuição da incidência de cancro por tipo em Portugal, referente ao ano de 2022. O gráfico apresenta a distribuição dos casos de cancro em Portugal no ano de 2022, totalizando 69.567 diagnósticos. Os tipos de cancro mais frequentes são colorretal (15,2%), mama (12,9%), próstata (10,8%) e pulmão (8,8%). (Fonte:(99))

1.2.1. Incidência do cancro da próstata

A próstata é um órgão pertencente ao sistema reprodutor masculino, localizado abaixo da bexiga, tendo como função secretar um líquido essencial para a manutenção e viabilidade dos espermatozoides.(35)

O CaP é um importante problema de saúde pública, pois é a doença maligna de órgãos sólidos mais comum em todo o mundo (36) e a principal causa de morte entre homens num quarto dos países do mundo. As diferenças globais na incidência e mortalidade do CaP podem estar associadas a diferenças no diagnóstico entre países, nos tipos de exames imagiológicos utilizados e ao acesso a cuidados de saúde.(37) Além destes, a predisposição genética, o estilo de vida, a idade, a raça e o histórico familiar também podem contribuir para estas diferenças.(37–39)

Em Portugal, este tipo de cancro é o mais comum entre os homens e a segunda principal causa de morte, depois do cancro do pulmão.(40) De acordo com o Registo Oncológico Nacional, no ano de 2020, houveram 5776 novos casos de CaP em Portugal e 1945 mortes.(41) Segundo

estimativas da GLOBOCAN(42) , estima-se que em 2040, o número de novos casos aumente para 9040. A prevalência tem aumentado devido ao envelhecimento da população e à melhoria das técnicas de diagnóstico, como o teste do Antígeno Específico da Próstata (PSA), o toque retal, a ecografia transretal e a biópsia prostática.(43)

1.2.2. Patologias prostáticas mais comuns

Globalmente, as doenças da próstata representam uma causa importante de morbidade e mortalidade em homens adultos podendo ser de natureza benignas ou malignas. (44) As doenças mais frequentemente encontradas são a prostatite, a hiperplasia benigna da próstata e o CaP.(45)

A prostatite refere-se a um grupo heterogêneo de doenças da próstata que resultam numa inflamação da mesma e está associada a sintomas como aumento da frequência urinária, dores no corpo e, por vezes, febre.(35,46) Pode resultar de infeções bacterianas, que podem ser agudas ou crónicas, causadas por agentes patogénicos típicos do trato urinário, ou por fatores inflamatórios não infecciosos.(46)

A hiperplasia benigna da próstata refere-se ao crescimento adenomatoso não maligno da próstata, resultando na formação de nódulos discretos na região periuretral. Este aumento de tamanho, muitas vezes associado ao envelhecimento, pode comprimir a uretra, resultando em sintomas urinários, como sensação de esvaziamento incompleto da bexiga, aumento da frequência urinária e fluxo de urina fraco.(47)

O CaP surge maioritariamente na zona periférica da próstata, sendo na maioria dos casos assintomático e de crescimento lento.(45) A maior parte dos CaP são adenocarcinomas principalmente de origem acinar, que apresentam um melhor prognóstico comparativamente aos de origem ductal.(48)

A neoplasia intraepitelial prostática (PIN) é considerada uma lesão precursora do adenocarcinoma, representando o crescimento anormal de células epiteliais dentro de ductos ou ácinos pré-existentes. Embora outras lesões prostáticas possam estar associadas à formação de carcinomas, a PIN é a mais fortemente associada ao desenvolvimento de adenocarcinomas.(49)

Nos últimos anos, alguns estudos (50,51) identificaram microorganismos patogénicos, incluindo vírus e bactérias, em tecidos prostáticos, sugerindo que infeções crónicas podem desempenhar um papel no desenvolvimento do CaP. Microorganismos como *Escherichia coli* e

Pseudomonas, comuns no trato urinário, podem infectar a próstata, especialmente quando o sistema imunológico está enfraquecido ou quando há lesões no trato urinário. Bactérias transmitidas sexualmente, como *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* e *Trichomonas vaginalis*, também foram associadas a inflamações prostáticas.(51)

Quanto à relação entre o HPV e o CaP, os estudos existentes apresentam resultados contraditórios. Estudos mais recentes (39,53) sugerem uma associação positiva entre a infecção por HPV e o risco de desenvolvimento do CaP, enquanto outros (17,54) não encontram uma correlação clara. Serão necessários mais estudos para esclarecer o papel do HPV no desenvolvimento do CaP.

1.3. Métodos moleculares para a detecção do HPV

Existem vários métodos moleculares para a detecção de DNA viral em amostras de biópsia e citologia em meio líquido, cada um com especificidades e sensibilidades distintas. Entre os mais utilizados estão a PCR e os ensaios baseados em captura híbrida, que variam em precisão e aplicabilidade clínica. Nos últimos anos, mais de 100 testes para a detecção do HPV foram desenvolvidos, variando não apenas na quantidade de genótipos detectados, mas também nos princípios dos métodos e sua aplicação clínica. (55)

1.3.1. Captura Híbrida

O método de captura híbrida consiste na detecção de uma dada sequência específica da molécula de DNA do HPV através da sua hibridação com uma sonda de RNA complementar, havendo a formação de moléculas híbridas DNA-RNA. A detecção destas moléculas híbridas é efetuada através da transferência das amostras contendo estes híbridos para uma microplaca, onde cada poço é revestido com anticorpos dirigidos especificamente a essas moléculas híbridas. Esses anticorpos são conjugados com a enzima fosfatase alcalina, que, após adição do substrato, gera um produto final que emite luz, sendo a intensidade do sinal proporcional à quantidade de DNA alvo presente na amostra. (56)

Embora o método de captura híbrida seja eficaz para a detecção de HPV, esta metodologia não é adequada para a genotipagem específica do vírus, ou seja, não permite identificar quais genótipos de HPV presentes.

1.3.2. PCR

A PCR é um método chave da biologia molecular, que permite a amplificação de uma dada sequência de DNA ou de DNA complementar e é um método amplamente utilizado para a detecção do HPV. A amplificação é efetuada através de uma enzima, a Taq DNA polimerase, proveniente da bactéria termofílica *Thermus aquaticus*, que resiste a altas temperaturas, como a que é utilizada para a desnaturação do DNA.(57) O processo da PCR envolve três etapas principais: a desnaturação; emparelhamento e extensão.

A **desnaturação da molécula de DNA** ocorre a temperaturas entre 94°C e 96°C, onde as ligações de hidrogénio entre as bases de DNA se rompem, causando a separação da cadeia dupla de DNA em duas cadeias simples.

O **emparelhamento** corresponde à ligação de oligonucleótidos, os *primers*, por complementaridade a sequências específicas do DNA alvo; para tal a temperatura é reduzida para cerca de 55°C.

A **extensão** é a etapa em que ocorre a síntese de novas cadeias de DNA a partir de cadeia de DNA molde pela DNA polimerase que tem uma atividade ótima aos 72°C.

Este ciclo desnaturação, emparelhamento e extensão, é repetido várias vezes, resultando numa amplificação exponencial do DNA alvo.(56,57)

A detecção do HPV por meio da PCR é amplamente reconhecida pela sua elevada sensibilidade e especificidade, embora enfrente algumas limitações. Essas limitações podem ser divididas em diferentes categorias: técnicas, como o tamanho do fragmento amplificado e a escolha dos *primers*; diversidade viral, onde a presença de múltiplos genótipos pode favorecer a amplificação de um genótipo dominante, dificultando a detecção de outros; reagentes e enzimáticos, incluindo a competição entre *primers* e a eficiência da polimerase; e sensibilidade, uma vez que a PCR pode detetar quantidades muito baixas do vírus que não têm relevância clínica.(57). Isso implica que os laboratórios necessitam de estabelecer um limite de detecção que represente um resultado clinicamente significativo.(56) Apesar dessas limitações, a PCR é vantajosa para amostras com baixa quantidade de DNA, permitindo a análise de amostras que seriam inadequadas para outras técnicas. Para superar essas limitações, muitas vezes são necessárias abordagens complementares, como sequenciação ou PCR específica para genótipos individuais.(58)

Na PCR, podem ser utilizados *primers* específicos, que amplificam apenas um genótipo de HPV, ou *primers* de consenso (como os *primers* GP5/GP6), que reconhecem uma região

conservada entre diversos genótipos, como a região L1.(58) O uso de *primers* específicos pode ser menos eficiente, pois exige múltiplas reações para uma única amostra, aumentando o tempo e o custo do processo. Por outro lado, os *primers* de consenso são mais práticos e eficazes em identificar a presença de diferentes genótipos numa única reação. No final do processo da PCR, o produto amplificado pode ser analisado de várias formas, incluindo a eletroforese em gel de agarose, permitindo a visualização e a comparação do tamanho do DNA amplificado. (56)

1.3.3. PCR-RFLP

A técnica de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (do inglês “Restriction Fragment Length Polymorphism” – RFLP) envolve a digestão do produto amplificado com enzimas de restrição específicas, resultando em fragmentos de DNA de vários comprimentos, que são separados através de uma eletroforese em gel de agarose e visualizados.

Embora a RFLP seja uma técnica relativamente simples e não exija equipamentos sofisticados, o que a torna acessível a instituições com recursos financeiros limitados, apresenta algumas limitações, sendo uma delas a complexidade na interpretação dos resultados, uma vez que a digestão pode gerar vários fragmentos, tornando a análise mais difícil. Essa característica pode dificultar a identificação clara dos genótipos ou a análise de variantes específicas. (58,59)

Além disso, a RFLP é mais adequada para detecções de variantes genéticas em amostras onde a informação sobre a sequência de nucleótidos é conhecida, não sendo muito eficaz nos casos em que há grande diversidade genética ou em populações altamente heterogêneas. Em suma, enquanto o RFLP oferece uma abordagem prática e de baixo custo para a detecção de polimorfismos, a sua limitação na interpretação de dados e a produção de múltiplos fragmentos devem ser consideradas. (62,63)

1.3.4. PCR em tempo real

A técnica de PCR em tempo real é uma abordagem avançada para a detecção e quantificação de DNA, utilizando sondas marcadas com fluorocromos que podem ser específicas ou não específicas para o alvo. As sondas específicas, como as *TaqMan*, emitem fluorescência ao se ligarem a sequências de DNA amplificado durante a PCR, permitindo a quantificação precisa do DNA alvo. Neste método, a polimerase degrada a sonda durante a amplificação, o que resulta na liberação de um grupo fluorescente que aumenta a fluorescência detectada. Em contrapartida, os corantes não específicos, como o SYBR Green, ligam-se a qualquer DNA de cadeia dupla,

gerando fluorescência proporcional à quantidade total de DNA presente. Apesar de serem mais simples e económicos, os corantes não específicos podem comprometer a especificidade da deteção, uma vez que a fluorescência pode resultar de produtos indesejados ou contaminantes.(60)

Uma das principais vantagens da PCR em tempo real é a capacidade de monitorizar a amplificação do DNA em tempo real, refletida na variação da intensidade da fluorescência ao longo dos ciclos de amplificação. A variação da intensidade da fluorescência ao longo dos ciclos de amplificação fornece uma curva de amplificação, que é crucial para a quantificação relativa da carga viral. O ponto em que a curva de amplificação cruza a linha de limite de deteção (*threshold*) é conhecido como ciclo limite (do inglês "cycle threshold" - Ct). Um valor de Ct menor indica uma maior carga viral, significando que o vírus foi detetado num momento mais precoce do processo de amplificação. Essa relação entre a carga viral e o valor de Ct é fundamental na interpretação de resultados de testes de diagnóstico, permitindo uma quantificação relativa da presença viral na amostra.(57)

Além da sua sensibilidade e especificidade, a PCR em tempo real, é uma ferramenta de diagnóstico rápida e reprodutível, com um risco relativamente baixo de contaminação cruzada, o que a torna ideal para aplicações clínicas e para a investigação. Esta técnica permite a deteção simultânea de múltiplos genótipos de HPV, como HPV 16 e HPV 18, através do uso de sondas fluorescentes específicas para cada genótipo. Ao incluir estas sondas na reação, cada uma emite um sinal fluorescente distinto, permitindo a monitorização da amplificação de cada genótipo em tempo real. Assim, é possível identificar os diferentes genótipos presentes na amostra, aumentando a eficiência da genotipagem e a monitorização das infeções virais.(55,59)

1.3.5. Sequenciação de Sanger

A sequenciação de Sanger é uma técnica usada para identificar a sequência de nucleótidos de um fragmento de DNA, funcionando como uma espécie de "leitura" do código genético. O processo envolve a síntese de uma molécula de DNA, onde são usados nucleótidos normais (desoxirribonucleótidos trifosfato- do inglês "deoxynucleotides triphosphate"- dNTPs) e nucleótidos modificados chamados didesoxirribonucleótidos trifosfato (do inglês "dideoxynucleotides triphosphate"- ddNTPs). Estes últimos atuam como bloqueadores da síntese, pois quando são incorporados à nova cadeia de DNA, impedem a continuação do

processo. Cada ddNTP é marcado com um fluorocromo diferente, podendo desta forma discriminar as diferentes bases do DNA (A, T, C, G).(61).

Durante o processo de síntese da nova molécula de DNA, a partir da molécula molde, a síntese é interrompida quando um desses ddNTPs marcados é adicionado. Nesta metodologia são gerados fragmentos de DNA de diferentes tamanhos, cada um terminando com um nucleótido marcado, que são separados por eletroforese capilar, uma técnica automatizada onde os fragmentos de DNA migram através de um capilar fino. Um laser detecta a fluorescência emitida pelos ddNTPs que é traduzida num gráfico chamado eletroferograma, que representa a sequência de nucleótidos pelo tamanho dos fragmentos. As sequências de DNA geradas podem ser comparadas com bases de dados como o GenBank através do software BLAST, sendo essa uma técnica útil para a análise clínica de rotina, nomeadamente para a identificação de mutações genéticas ou genótipos específicos de vírus.(61)

A sequenciação de Sanger apresenta a vantagem de ser uma técnica muito robusta, capaz de identificar com precisão mutações pontuais e pequenas inserções ou deleções em amostras de DNA. Uma das limitações desta metodologia ocorre quando há múltiplos genótipos presentes na amostra, como no caso de infeções por vários genótipos de HPV. Nessas situações, o eletroferograma pode exibir picos sobrepostos, o que dificulta a identificação clara das sequências de DNA, tornando a interpretação mais trabalhosa e complexa. Assim, apesar de ser uma técnica fidedigna e amplamente utilizada, requer análises detalhadas em amostras geneticamente heterogéneas, o que pode limitar a sua aplicabilidade em certos contextos.(62)

1.3.6. NGS

A NGS é uma metodologia relativamente recente sendo uma metodologia avançada para a genotipagem do HPV, oferecendo diversas vantagens em relação aos métodos tradicionais. Uma das principais vantagens é a capacidade de analisar simultaneamente várias amostras de uma só vez o que aumenta a eficiência do processo. Além disso, a NGS é altamente precisa, conseguindo identificar infeções múltiplas e detetar novas variantes e genótipos de HPV com grande sensibilidade.(63)

O princípio da metodologia NGS envolve a fragmentação do DNA ou RNA em pequenas sequências que são, em seguida, amplificadas e sequenciadas repetidamente. Dependendo do objetivo, pode-se optar por sequenciar o genoma completo do HPV ou focar a sequenciação em

áreas específicas, como genes relevantes para a infecção viral ou mutações importantes.(64,65) Essa flexibilidade é uma das grandes vantagens da NGS.

O processo completo da NGS inclui várias etapas: identificação da amostra; extração dos ácidos nucleicos; preparação da biblioteca (onde os fragmentos de DNA são preparados para sequenciação); sequenciação propriamente dita; e a análise bioinformática, que organiza e interpreta os dados gerados.(66) A análise bioinformática é crucial, pois permite identificar e caracterizar os genótipos do HPV com base nas sequências obtidas.

Embora a NGS ofereça uma melhoria significativa na precisão do diagnóstico do HPV, a sua prática ainda não está amplamente disponível em laboratórios clínicos de rotina. Isso deve-se, em grande parte, à falta de padronização em relação às diretrizes de qualidade e ao alto custo associado à tecnologia, o que limita a sua aplicação, especialmente em países ou populações com menos recursos.(66) No entanto, a NGS poderia, no futuro, revolucionar o diagnóstico do HPV, uma vez que oferece uma capacidade de detecção muito mais sensível do vírus, incluindo variantes que podem ser descuradas por outros métodos.

Atualmente, não há uma técnica molecular considerada "ideal" para a detecção do HPV. Cada método tem vantagens e limitações, variando em sensibilidade, custo e complexidade. O futuro das técnicas de diagnóstico molecular do HPV depende da evolução de métodos que sejam simultaneamente rápidos, automatizados e de baixo custo, de modo a serem acessíveis a populações e regiões com menos recursos.(59) Este avanço seria crucial para aumentar a eficiência do diagnóstico do HPV, promovendo um rastreamento mais preciso e abrangente em escala global.

1.4. Objetivos

O presente estudo tem como objetivos:

- Implementar e validar um novo kit para detecção do HPV, baseado em PCR em tempo real e com utilização de sondas conjugadas com fluorocromos da Mospire®;
- Pesquisar a infecção pelo HPV em tecido prostático de indivíduos com suspeita clínica de CaP;
- Averiguar a existência de associação entre a infecção por HPV e o CaP.

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostras

No presente estudo foram utilizadas 32 amostras de DNA resultantes da rotina laboratorial do Ipatimup Diagnósticos, para otimizar e validar um novo kit de amplificação de DNA do HPV. Estas amostras e os seus dados foram tratados de acordo com os procedimentos regulatórios internos, e são provenientes de citologias em meio líquido (n=23) e de tecido fixado em formol a 10 % tamponado e incluído em parafina (do inglês "Formalin-Fixed Paraffin-Embedded" - FFPE) (n=9). A validação do novo kit foi efetuada pela comparação dos resultados obtidos por este kit com os resultados previamente obtidos para estas amostras pelo método CLART®HPV 4, sendo calculada a taxa de concordância entre os dois métodos. Para alcançar os outros dois objetivos, pesquisar a infeção pelo HPV em tecido prostático de indivíduos com suspeita clínica de CaP e averiguar possível associação entre infeção do HPV e CaP, foram utilizadas 188 amostras de DNA extraído de tecido prostático congelado proveniente de biópsias de próstata de doentes com suspeita de CaP do Centro Hospitalar Universitário São João (CHUSJ), aprovado pela comissão de ética do mesmo hospital.(67)

2.2. Extração de DNA

A extração do DNA das amostras utilizadas para a implementação e validação do novo kit foi efetuada pelo método de extração automático Maxwell® - RSC DNA FFPE Kit que se baseia na digestão enzimática das proteínas presentes nas amostras e na utilização de partículas magnéticas para capturar e purificar o DNA.(68) Este é o método mais adequado para a extração de DNA a partir de tecido FFPE, onde a automatização é importante para lidar com a degradação do DNA neste tipo de amostras.

A extração do DNA do tecido prostático congelado foi efetuada pelo método de extração manual, utilizando o kit QIAamp DNA Micro (*Qiagen*). Este kit utiliza colunas de sílica para a purificação do DNA. Assim, após a lise celular, a amostra é deitada numa coluna de sílica onde o DNA, presente na amostra, se liga à membrana de sílica; através de lavagens sucessivas com uma solução tampão, são removidas as impurezas da amostra.(69) Este é um método de extração ideal para amostras de tecidos frescos ou congelados com pouca quantidade de DNA.

2.3. Quantificação e avaliação da qualidade de DNA

A avaliação da qualidade e a quantificação do DNA extraído das diferentes amostras foram efetuadas por espectrofotometria. A partir do valor da absorvância de uma dada amostra da medida ao comprimento de onda de 260 nm (A260) é possível calcular a concentração de DNA presente na amostra. A leitura de absorvância aos comprimentos de onda 230 nm (A230), 260 nm (A260) e 280 nm (A280) permite calcular os rácios A260/A280 e A260/A230 que ajudam a avaliar a pureza da amostra. Um rácio A260/A280 próximo de 1,8 indica que o DNA é relativamente puro, enquanto um rácio A260/A230 entre 2,0 e 2,2 sugere uma amostra livre de contaminantes. Desvios desses valores indicam uma possível contaminação da amostra por sais, solventes ou outras substâncias que podem eventualmente interferir com métodos usados para o estudo do DNA, como a PCR. (70) É importante destacar que a espectrofotometria pode não ser precisa em amostras com quantidades muito baixas de DNA viral, uma vez que a sua sensibilidade é limitada e a presença de contaminantes pode interferir nas medições. Por isso, é aconselhável utilizar métodos alternativos, como a PCR em tempo real, que oferece uma sensibilidade e especificidade significativamente superiores, permitindo a quantificação precisa de DNA, mesmo em níveis reduzidos, e minimizando a interferência de contaminantes. (71)

As leituras espectrofotométricas das amostras utilizadas para a implementação e validação do novo kit foram efetuadas no espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (*Thermo Fisher Scientific, Wilmington*) que requer um volume mínimo de amostra, entre 0.5 a 2 µL, e abrange um espectro de leituras entre os 190 a 840 nm, com um limite de deteção de DNA de 2 ng/µL.(72) As leituras espectrofotométricas das amostras de DNA proveniente do tecido prostático congelado, foram efetuadas no espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (*Thermo Fisher*) que requer um volume mínimo de amostra de 1 µL, e tem espectro de leitura mais limitado, entre 220 nm e os 750 nm, apresentando o mesmo limite de deteção de DNA que o NanoDrop™ 2000 (*Thermo Fisher*). (73)

Quando a concentração de DNA numa amostra é inferior a 50 ng/µL, os valores dos rácios A260/A280 e A260/A230 não devem ser considerados confiáveis para avaliar a pureza do DNA. Isto deve-se ao facto de, em concentrações tão baixas, a precisão das medições pode ser afetada por ruídos de fundo e limitações do equipamento utilizado.(74) Como a maioria das amostras analisadas neste estudo (94%) apresentaram concentrações de DNA abaixo desse limite, os rácios de absorvância não foram considerados, a fim de evitar interpretações erradas sobre a avaliação da pureza das amostras.

2.4. Detecção do DNA do HPV por PCR em tempo real

A detecção do DNA de HPV foi efetuada segundo as instruções do novo kit de amplificação de DNA do HPV, baseado em PCR em tempo real com sondas conjugadas com fluorocromos da Mospire®. Este kit permite a detecção qualitativa de DNA de 24 genótipos do HPV em amostras de citologia em meio líquido e tecido FFPE. Os *primers* e as sondas conjugadas com fluorocromos *TaqMan* deste kit são desenhados especificamente para os locais E6/E7 do genoma do HPV. As sondas são marcadas com fluorocromos distintos: o FAM (*6-carboxyfluorescein*), que emite luz na região verde, o VIC (*2'-chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein*), que emite luz na região verde-amarela e o ROX (*6-carboxy-x-rhodamine*), que emite luz na região do vermelho. Os *primers* e a sonda do controlo interno deste kit são desenhados a partir de sequências do gene humano ApoB (HAPB) e a sonda é marcada com o fluorocromo Cy5 (*Invitrogen Cyanine5*), que emite luz na região vermelho brilhante.

O kit de amplificação de DNA do HPV da Mospire® contém vários reagentes que permitem uma detecção eficiente de diferentes genótipos de HPV. Esses reagentes já se encontram nos poços onde ocorrem as reações de amplificação. Assim, cada kit contém 24 tiras, cada uma com 8 poços e em cada poço está presente uma mistura de dNTPs, magnésio, *primers* e sondas específicas para diferentes genótipos de HPV (Tabela 1) e para o gene humano HAPB, a enzima Uracil-DNA glicosilase (do inglês "Uracil-DNA Glycosylase" – UDG) que tem como função remover uracilos incorretamente incorporados no DNA, prevenindo mutações e garantindo a estabilidade genética e a enzima Taq DNA polimerase.

Tabela 1- Genótipos de HPV identificados em cada poço de uma dada tira presente no kit de amplificação de DNA do HPV da Mospire®

Poço	Genótipos de HPV detetados
1	16, 18 e 31
2	33, 35 e 39
3	45, 51 e 52
4	56, 58 e 59
5	68, 26 e 53
6	66, 73 e 82
7	6, 11 e 42
8	43, 44 e 81

Além das tiras de 8 poços, o kit ainda inclui controlos que desempenham um papel fundamental para a validação dos resultados. O controlo positivo contém fragmentos dos genes E6/E7 detetados nos 24 genótipos do HPV e do gene humano HAPB, enquanto o controlo negativo contém apenas fragmentos do gene humano HAPB. O kit fornece ainda dois tubos com água sem nucleases, para as reações serem preparadas sem interferência das nucleases que degradam o DNA.

De acordo com o protocolo que acompanha o kit (anexo 2), a cada poço, deve ser adicionado 5 µL de amostra à mistura de reação. Para garantir a deteção dos 24 genótipos de HPV nas diversas amostras, é necessário um volume total de amostra de 40 µL. Após extração, algumas amostras usadas para a implementação e validação do método não possuíam o volume necessário de 40 µL, o que impossibilitou a deteção dos 24 genótipos de HPV. Como esse grupo de amostras já tinha sido previamente genotipado pelo método CLART® HPV 4, apenas foi confirmada a presença dos genótipos detetados anteriormente. Dessa forma, no novo kit da Mospire®, foi adicionada amostra apenas aos poços que continham a mistura de reação correspondente ao genótipo anteriormente identificado. Os controlos positivo e negativo incluídos no novo kit da Mospire® e as amostras de DNA extraídas do tecido prostático congelado, continham o volume necessário de 40 µL, sendo possível detetar a presença dos 24 genótipos de HPV.

Para amplificação da PCR em tempo real foram utilizados os termocicladores 7500 Fast da *Applied Biosystems* configurado no modo presença/ ausência "presence/absence" e o CFX96 da *Bio-Rad*. Os resultados da amplificação obtida pelo termociclador 7500 Fast foram avaliados através da aplicação "Design and Analysis New qPCR" da *Cloud* disponibilizada no site da *Thermo Fisher* e os resultados da amplificação obtida pelo termociclador CFX96 foram avaliados através do *software* associado ao termociclador CFX Maestro (v 2.2).

Em ambos os equipamentos, a análise dos resultados teve por base os valores do ciclo limite (do inglês "threshold cycle" - Ct) que corresponde à interseção entre a curva de amplificação e o limiar de fluorescência (linha de *threshold*), a forma das curvas de amplificação e a presença/ausência de cada um dos fluorocromos. Assim, no controlo negativo, o valor de Ct deve ser menor ou igual a 30 para o fluorocromo Cy5 (o que corresponde ao controlo interno) e não deve ser quantificado nos outros três fluorocromos. No controlo positivo, o valor de Ct deve ser positivo para os quatro fluorocromos (menor ou igual a 30 para o Cy5 e menor ou igual a 34 para

os restantes fluorocromos). Estes requisitos devem ser avaliados no mesmo ensaio e em simultâneo, caso contrário a PCR é considerada inválida e deve ser efetuada novamente.

Quando todos os requisitos estão presentes, a análise e interpretação dos resultados das amostras deve ser efetuada da seguinte forma: i) se o valor de Ct para o fluorocromo Cy5 for menor ou igual a 30 com uma curva típica de PCR em tempo real, denominada curva de amplificação tipo-S, a interpretação dos resultados deve considerar o valor de Ct dos restantes fluorocromos e a curva associada a cada um deles.; ii) se não houver amplificação em nenhum dos quatro fluorocromos, incluindo o Cy5, o resultado é considerado inválido e o ensaio deve ser repetido, se possível, utilizando a mesma amostra.

Posto isto, no presente estudo, uma amostra é considerada positiva quando apresenta um valor de Ct positivo para o fluorocromo Cy5 e para pelo menos um dos outros fluorocromos e as curvas de amplificação apresentam a forma típica (tipo-S). Uma amostra é considerada negativa quando apresenta um valor de Ct positivo apenas para o fluorocromo Cy5, com uma curva de amplificação típica, mas sem valor de Ct nos restantes fluorocromos. Uma amostra é considerada inconclusiva quando apresenta um valor de Ct positivo para o fluorocromo Cy5 e para pelo menos um dos outros fluorocromos, mas com a curva de amplificação do fluorocromo Cy5 com a forma típica (tipo-S), enquanto a curva de amplificação de um dos outros fluorocromos não apresenta o mesmo comportamento. Por fim, uma amostra é considerada inválida, quando não há valor de Ct para nenhum dos fluorocromos, incluindo o Cy5 nem formação de curvas de amplificação.

2.5. Amplificação por PCR convencional

Os resultados inconclusivos ou inválidos obtidos pelo método da PCR em tempo real foram confirmados através da PCR convencional, seguida de eletroforese e sequenciação de Sanger. Para a amplificação por PCR convencional, de cada uma dessas amostras foram efetuadas duas réplicas utilizando dois pares de *primers* diferentes, que amplificam a região L1 do genoma do HPV.(75) A sequência dos *primers* e o tamanho do produto amplificado encontram-se registados na Tabela 2.

Tabela 2– Sequências dos pares de *primers* usados para a amplificação do HPV pelo método da PCR convencional

<i>Primer</i>	Sequência	Tamanho do produto amplificado (bp)
GP5	5'-TTTGTACTGTGGTAGATAC-3'	150
GP6	5'-ACTAAATGTCAAATAAAAAG-3'	150
MY09	5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'	450
MY11	5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'	450

A amplificação do DNA do HPV foi efetuada pelo kit QIAGEN[®] Multiplex PCR que inclui uma mistura de reação composta por uma DNA polimerase termoestável (*HotStartTaq DNA Polymerase*), dNTPs, tampão e magnésio. O kit contém, ainda, uma solução tampão, a *Q-Solution*, que melhora a amplificação do DNA, minimizando as estruturas secundárias e aumentando a especificidade e o rendimento da reação. (76)

O procedimento foi adaptado do protocolo do kit QIAGEN[®] Multiplex PCR. (76) A otimização da quantidade de reagentes usada foi baseada numa validação prévia realizada pelo Ipatimup diagnósticos (Tabela 3). Seguiu-se o protocolo do kit para as condições de PCR (Tabela 4), sendo que a única modificação feita foi nas temperaturas de *annealing*. Para ajustar estas temperaturas em cada conjunto de *primers*, foram realizados testes de gradiente no termociclador (*Bio-rad*) com base nas temperaturas de *melting* (T_m) dos *primers*, que indicam a temperatura ideal para a ligação dos *primers* ao DNA alvo durante a PCR.

Tabela 3– Reagentes do kit QIAGEN[®] Multiplex PCR utilizados para a amplificação por PCR do DNA do HPV

Reagente	Quantidade (µL)	
	Validação Ipatimup Diagnósticos	Nova validação
<i>Master Mix</i>	7,5	7,5
Água (sem nucleases)	Até perfazer 16 µL	Até perfazer 16 µL
<i>Q-solution</i>	1	1
<i>Primer Forward+ Reverse</i> (10 µmol)	0,75 + 0,75	0,35+ 0,35 (GP5/GP6) 0,57 + 0,57 (MY09/MY11)
DNA (50-100 ng/µL)	1-2	1-2
Total	16	16

Tabela 4- Condições de PCR para a amplificação do DNA do HPV utilizando o kit QIAGEN® Multiplex PCR

Condições de PCR do kit QIAGEN® Multiplex PCR			
Passo	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (min:seg)
Ativação inicial	1	95	15:00
Desnaturação	30-45	94	00:30
Annealing		57-63	1:30
Extensão		72	1:30
Extensão Final	1	72	10:00
Validação das condições de PCR do kit QIAGEN® Multiplex PCR			
Passo	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (min:seg)
Ativação inicial	1	95	15:00
Desnaturação	40	94	00:30
Annealing		50(GP5/GP6) 55(MY09/MY11)	1:30
Extensão		72	1:30
Extensão Final	1	72	10:00

Em cada amplificação foi incluído um controlo negativo, que corresponde a um tubo com a mistura de reação sem DNA, a fim de monitorizar possíveis contaminações. Deste modo, foram apenas validadas as amplificações em que o controlo negativo não apresentava produto de amplificação.

2.6. Eletroforese

Os produtos amplificados por PCR convencional foram submetidos a uma eletroforese horizontal em gel de agarose a 2% (200V durante 15 minutos) de forma a separar os diferentes fragmentos amplificados de acordo com o seu peso molecular. No carregamento, no primeiro poço foram adicionados 5 µL do marcador de peso molecular (*100 bp DNA Ladder, Solis BioDyne*) e nos restantes foi adicionado 5 µL de cada amostra juntamente com o tampão de carregamento (*6X DNA Loading Buffer, Transgen Biotech*). Os fragmentos foram visualizados através do transiluminador *Gel Doc EZ System (Bio-Rad)*.

2.7. Sequenciação de Sanger

Após separação dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose, foram selecionadas apenas as amostras com produtos de amplificação visíveis no gel para a sequenciação de Sanger, com o objetivo de determinar o genótipo de HPV presente em cada amostra. Primeiramente, foi efetuada uma purificação enzimática com o kit ExoSAP- IT™ Express PCR Product Cleanup segundo as instruções do fabricante (77). Este kit contém duas enzimas, a Exonuclease I que

digere os *primers* não incorporados e a fosfatase alcalina (do inglês “Shrimp Alkaline Phosphatase” - SAP) que digere os nucleótidos livres (remove os grupos fosfato) evitando que esses componentes interfiram nas reações seguintes.

Em seguida, foi feita a preparação da sequenciação utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (*Applied Biosystems*), que inclui dNTPs, ddNTPs marcados com fluorocromos, DNA polimerase e magnésio. A mistura da reação foi preparada com base na validação e otimização previamente estabelecidas pelo Ipatimup Diagnósticos, com as quantidades de reagentes especificadas na Tabela 5.

Tabela 5- Reagentes do kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing utilizados para a preparação da Sequenciação de Sanger

Reagente	Quantidade (µL)
<i>Buffer</i>	1
<i>Big Dye</i>	0,5
<i>Primer</i> (10 µmol)	0,5
Água (sem nucleases)	1,5
DNA (50-100 ng/µL)	1,5
Total	5

Esta mistura foi posteriormente incubada no termociclador (*Bio-rad*), conforme as condições expressas na Tabela 6, que também foram validadas e otimizadas pelo Ipatimup Diagnósticos.

Tabela 6- Condições de PCR para a Sequenciação de Sanger utilizando o kit QIAGEN® Multiplex PCR

Passo	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (min:seg)
1	1	96	02:00
2	33	96	00:10
		55	00:10
		60	01:00
3	1	60	10:00
		15	∞

Após a reação, foi realizada uma purificação em coluna, utilizando colunas de Sephadex™ G- 50 Fine (*Cytiva*), seguindo um método previamente validado pelo laboratório, com o objetivo de remover os excedentes da reação de sequenciação. Esta purificação foi realizada em colunas individuais. O processo consiste em encher a coluna com o Sephadex™ G- 50 Fine (*Cytiva*) e centrifugar (4400 rpm durante 4 minutos) para compactar a malha. Em seguida o produto amplificado foi deitado sobre a malha de Sephadex™ G- 50 Fine (*Cytiva*) e centrifugado

novamente sob as mesmas condições, para o produto filtrado cair num tubo com 10 µL de formamida que permite manter o DNA desnaturado e conservado.

O produto de sequenciação purificado foi transferido para o sequenciador 3500 XL (*Applied Biosystems*) para a realização da eletroforese capilar num gel de poliacrilamida, onde as sequências são alinhadas em ordem crescente de tamanho molecular. Após a obtenção dos dados, as sequências foram analisadas utilizando o *software* Sequencing Analysis 7 v7.1. Em seguida, foram comparadas com as disponíveis no GenBank usando o programa BLAST, acessível no site do NCBI. Esse processo possibilitou a identificação do genótipo do HPV presente em cada amostra.

2.8. Análise estatística

Os dados dos resultados das amostras de tecido prostático congelado foram analisados utilizando o *software* SPSS versão 26. Para caracterizar a amostra, foi usada a estatística descritiva, incluindo a análise de frequências absolutas e relativas. Para investigar a associação entre a infecção pelo HPV e a idade foram aplicados o teste do qui-quadrado de Pearson e a regressão logística. Para investigar uma possível associação entre infecção pelo HPV e o CaP para um dado grupo etário foi realizado o teste de regressão logística. Considerou-se que as diferenças encontradas são estatisticamente significativas quando o valor de p é inferior a 0,05 ($p < 0,05$).

A Figura 4 ilustra um resumo abrangente de todos os métodos utilizados neste estudo.

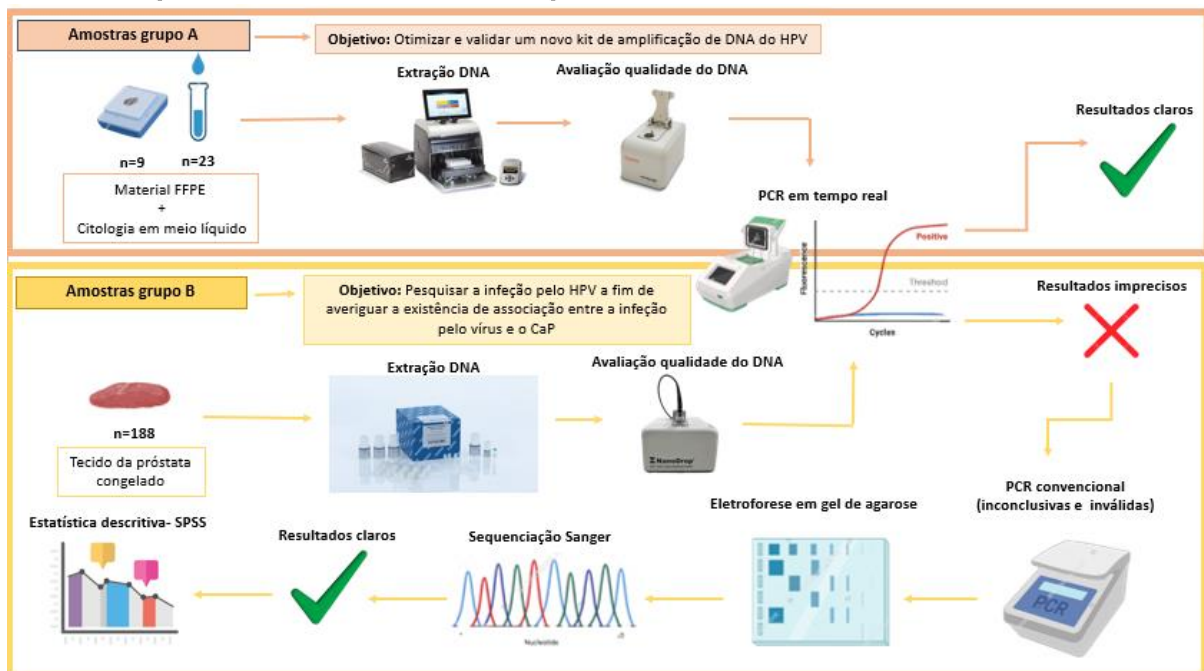


Figura 4- Fluxograma dos métodos aplicados no presente estudo nos dois grupos de amostras. No grupo A, o objetivo foi otimizar e validar um novo kit de amplificação de DNA do HPV, utilizando 9 amostras de tecido FFPE e 23 de citologia em meio líquido. O DNA depois de extraído e avaliada a qualidade, foi submetido a PCR em tempo real, desencadeando resultados claros e confiáveis. No grupo B, composto por 188 amostras de tecido da próstata congelado, o objetivo foi pesquisar a infecção pelo HPV a fim de investigar a associação entre o HPV e o CaP. Após a extração e a avaliação da qualidade do DNA, a PCR em tempo real apresentou resultados imprecisos em algumas amostras, que foram então submetidas à PCR convencional, eletroforese em gel de agarose e sequenciamento de Sanger, obtendo-se resultados confiáveis. Para atingir a segunda parte deste objetivo os resultados do grupo B foram analisados utilizando o *software* SPSS, com base numa análise descritiva.

3. Resultados

3.1. Extração e quantificação do DNA do HPV

No presente estudo as 32 amostras de DNA utilizadas para a implementação e validação do novo kit, provenientes de tecido FFPE e de células em citologia em meio líquido, foram obtidas por um método de extração automatizado, enquanto as 188 amostras de DNA de tecido prostático congelado, foram obtidas por um método de extração manual.

Em relação à quantificação do DNA, as amostras usadas para a implementação e validação do novo kit apresentaram um valor médio de concentração de DNA de 46,66 ng/μL, com valores que variam de 1 ng/μL a 228 ng/μL. De referir que apenas 11 amostras (34%) apresentaram concentrações de DNA superiores a 50 ng/μL. Por outro lado, as amostras de DNA obtido a partir de tecido prostático congelado apresentaram um valor médio de concentração de DNA de 17,58 ng/μL, com valores que oscilam de 1,40 ng/μL a 69,64 ng/μL, onde apenas 2 amostras (1%) apresentaram concentrações acima de 50 ng/μL.

3.2. Implementação e validação do kit de amplificação de DNA do HPV baseado em PCR em tempo real

A implementação do novo kit de amplificação de DNA do HPV foi conseguida uma vez que os resultados obtidos foram muito claros, permitindo identificar eficientemente a presença ou ausência de genótipos de HPV. As Figuras 5, 6 e 7 são representativas de um caso negativo (Figura 5) e de dois casos positivos, onde foram detetados um (Figura 6) ou mais genótipos de HPV (Figura 7).

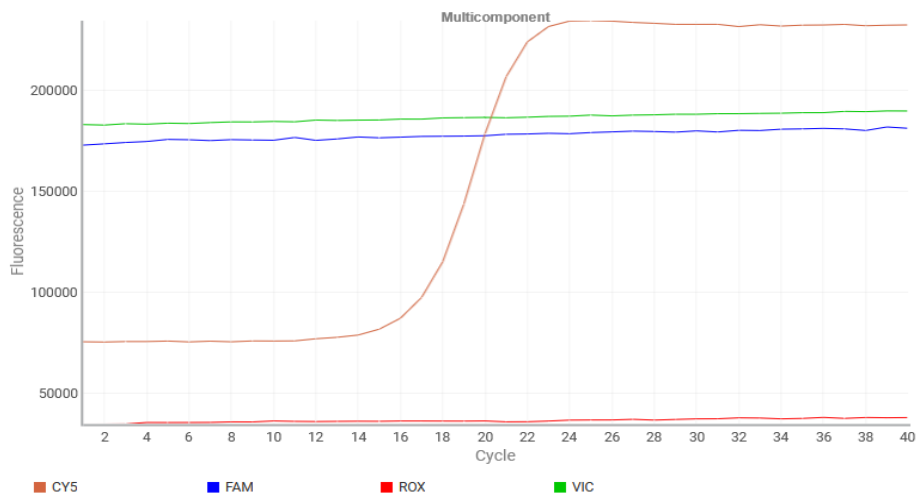


Figura 5- Curvas de amplificação de um caso negativo para a presença de DNA do HPV analisadas com a aplicação "Design and Analysis New qPCR" (Cloud, Thermo Fisher). A única amplificação observada é a correspondente à curva rosa relativa ao fluorocromo Cy5, utilizado para marcar o controle interno. Essa amplificação confirma a presença de DNA humano na amostra. A ausência de amplificação nas outras curvas sugere a ausência de DNA viral na amostra, indicando um resultado negativo para a presença de HPV.

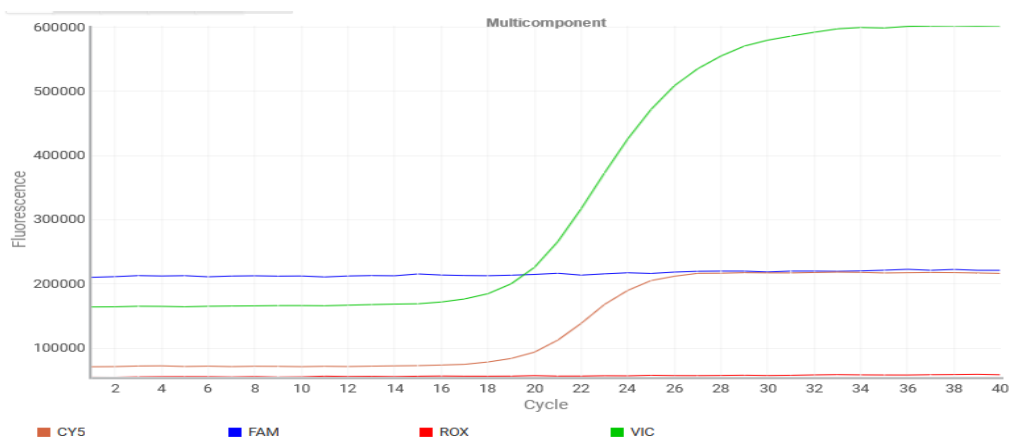


Figura 6- Curvas de amplificação de um caso positivo para um genótipo do HPV analisadas com a aplicação "Design and Analysis New qPCR" (Cloud, Thermo Fisher). Amplificação correspondente à curva verde, relativa ao fluorocromo VIC, que indica a presença de DNA viral do HPV-18. Além disso, a amplificação correspondente à curva rosa, que representa o controle interno através do fluorocromo Cy5 confirma a presença de DNA humano na amostra.

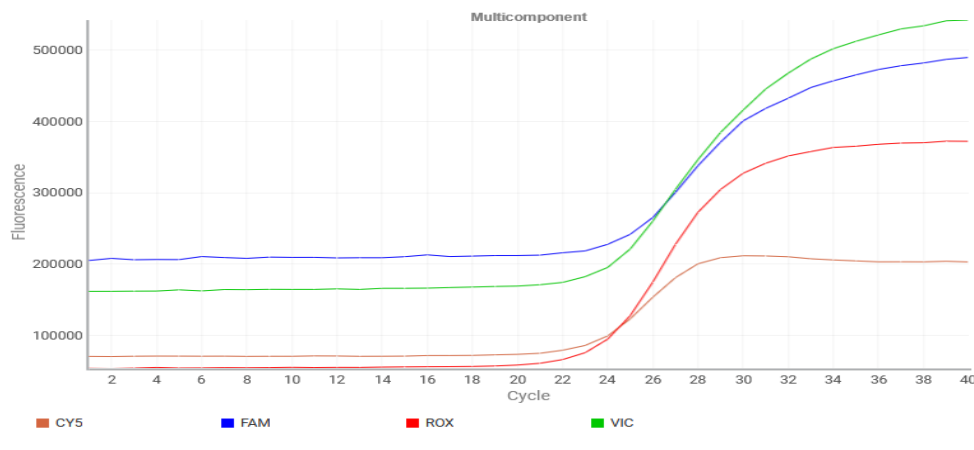


Figura 7- Curvas de amplificação de um caso positivo para três genótipos do HPV analisadas com a aplicação "Design and Analysis New qPCR" (Cloud- Thermo Fisher). Amplificação correspondente às quatro curvas: curva rosa, relativa ao fluorocromo Cy5, indica a presença do controlo interno; as curvas azul, vermelho e verde relativas aos fluorocromos FAM, ROX e VIC, respetivamente, indicam a presença de DNA viral dos genótipos HPV- 33, HPV-39 e HPV-35. A amplificação do controlo interno confirma a presença de DNA humano na amostra.

Para validação do novo kit de amplificação de DNA do HPV, os resultados obtidos com este kit foram comparados com os resultados obtidos com o teste CLART® HPV 4 (Tabela 7) que havia sido realizado com as mesmas amostras.

Tabela 7- Genótipos de HPV identificados pelo teste CLART® HPV 4 e pelo novo kit de amplificação de DNA do HPV da Mospire®

Genótipos de HPV identificados pelo teste CLART® HPV 4																	
6	11	16	18	26	31	33	35	39	40	42	43	44	45	51	52	53	54
56	58	59	61	62	66	68a	68b	70	71	72	73	81	82	83	84	85	89
Genótipos de HPV identificados pelo novo kit de amplificação de DNA do HPV da Mospire®																	
6	11	16	18	26	31	33	35	39	-	42	43	44	45	51	52	53	-
56	58	59	-	-	66	68	-	-	-	-	73	81	82	-	-	-	-

Uma análise dos dados obtidos pelos dois métodos de deteção do DNA do HPV permitiu verificar uma concordância de resultados em 28 amostras (88%) não ocorrendo concordância em 4 amostras (12%). De entre os resultados não concordantes, duas amostras revelaram a presença de um novo genótipo de HPV que não tinha sido detetado pelo método CLART® HPV 4, enquanto as outras duas amostras foram negativas para a deteção do DNA viral, contrariamente aos resultados obtidos pelo método CLART® HPV 4, que indicavam a presença de vírus.

É importante salientar que os controlos positivo e negativo incluídos no novo kit baseado em PCR em tempo real, apresentaram os resultados esperados, validando a eficácia do método.

O controlo negativo apresentou amplificação apenas para o fluorocromo que marca o controlo interno, sem deteção de DNA viral, o que confirma a ausência de contaminação nas amostras. O controlo positivo mostrou uma amplificação para todos os genótipos de HPV e também para o controlo interno, confirmando a precisão e a capacidade do novo método para a deteção de múltiplos genótipos de HPV em simultâneo.

3.3. Pesquisa do HPV em tecido prostático por PCR em tempo real

As amostras de DNA de tecido prostático congelado foram analisadas para investigar a presença do HPV através do novo kit de amplificação de DNA do HPV da Mospire® baseado em PCR em tempo real. Das 188 amostras analisadas, em 168 (89,4%) não foi detetado qualquer genótipo de HPV, em sete (3,7%) foi possível detetar infeção simples pelo HPV (seis amostras por genótipos de HPV de alto risco e uma amostra por um genótipo de HPV de médio risco), em dez amostras (5,3%) os resultados foram inconclusivos e em três (1,6%) amostras os resultados foram considerados inválidos. As Figuras 8 e 9 são representativas de um resultado inconclusivo e de um inválido, respetivamente.

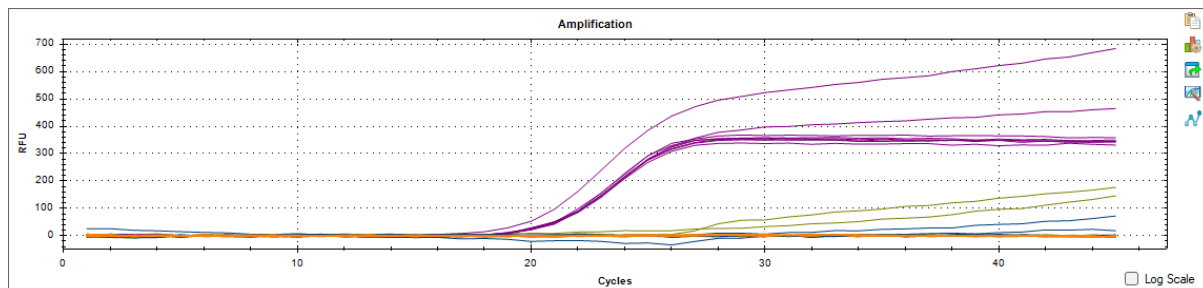


Figura 8– Curvas de amplificação de um caso com resultado inconclusivo para a presença de DNA do HPV, analisadas com *software* CFX Maestro (v 2.2) (Bio-Rad). As curvas de amplificação correspondentes ao fluorocromo Cy5 (representado a roxo) apresentam um padrão de amplificação do tipo-S, indicando a presença de DNA humano. Já as curvas dos fluorocromos VIC e FAM (representados a verde e azul, respetivamente) mostram uma leve amplificação, mas não exibem a forma típica de uma curva de amplificação, sugerindo resultados inconclusivos.

Os resultados inconclusivos e inválidos evidenciam a necessidade de repetir o ensaio ou adotar métodos complementares para a deteção do DNA viral, de forma a garantir um diagnóstico mais preciso e fidedigno.

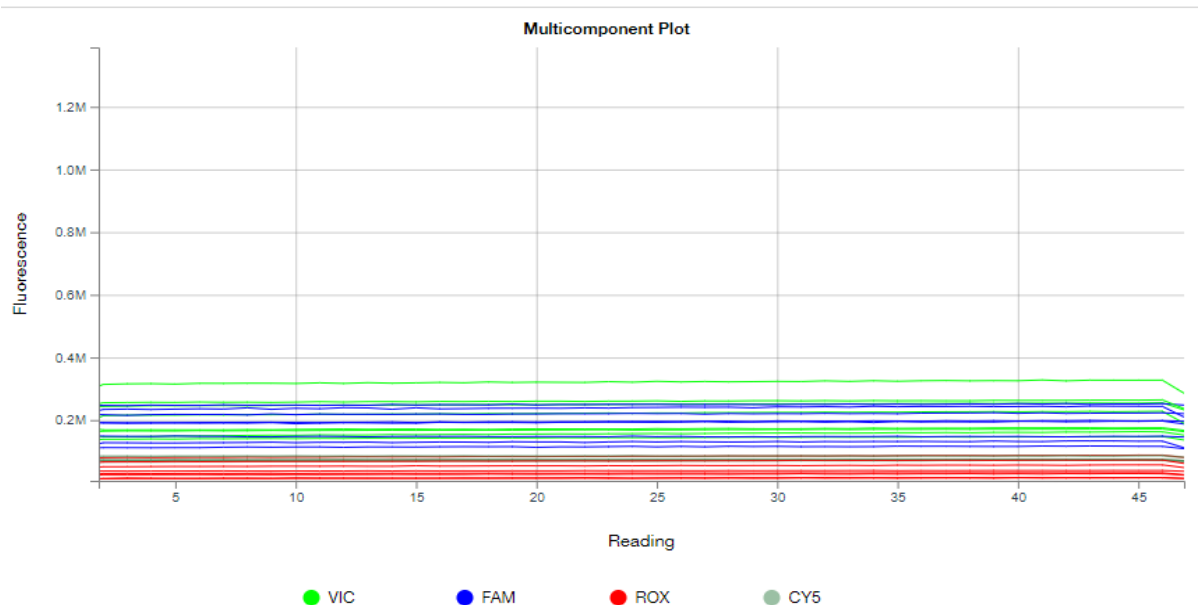


Figura 9- Curvas de amplificação de um caso com resultado inválido para a presença de DNA do HPV, analisadas com a aplicação "Design and Analysis New qPCR" (Cloud, Thermo Fisher). Nenhuma curva de amplificação do tipo-S é observada. Para que o resultado fosse considerado válido, seria necessário observar pelo menos a curva correspondente ao fluorocromo Cy5, representada a cinzento, que exibe o controlo interno.

3.3.1. Análise das amostras com resultados inconclusivos e inválidos

Das 13 amostras com resultados inconclusivos ou inválidos pelo método da PCR em tempo real, apenas 12 foram analisadas pela PCR convencional para confirmação dos resultados, uma vez que uma das amostras não possuía o volume de 3 μ L necessários para esta análise. Antes de efetuar a amplificação pelo método da PCR convencional, o kit QIAGEN® Multiplex PCR foi otimizado, nomeadamente a otimização das condições da PCR e as quantidades de reagentes utilizados.

Para otimizar as condições de PCR, foi realizado um teste de gradiente no termociclador (Bio-rad) para determinar a temperatura de *annealing* mais adequada para cada par de *primers*. Para testar os *primers* GP5/GP6 (Figura 10) foi utilizada uma amostra de validação do novo kit, positiva para o HPV, e os resultados da amplificação foram observados em gel de agarose. A análise mostrou que, à medida que a temperatura de *annealing* aumentava, as bandas inespecíficas desapareciam, enquanto a banda correspondente ao HPV se tornava mais intensa. Assim, a temperatura de 50 °C foi considerada a mais adequada, pois leva a uma amplificação específica do DNA do HPV, diminuindo as intensidades das bandas inespecíficas e aumentando a intensidade da banda alvo, o que indica uma melhor eficiência na reação da PCR.

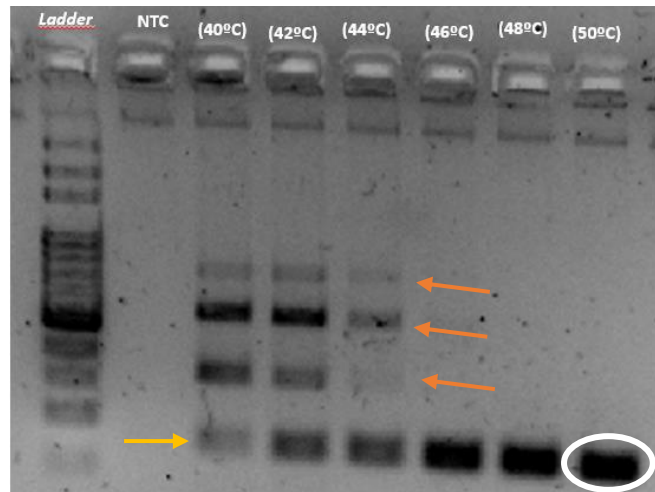


Figura 10- Eletroforese em gel de agarose a 2% demonstrando os resultados do teste de gradiente para os primers GP5/GP6 a fim de identificar a temperatura de *annealing* ideal. No 2º poço, o NTC não exibe banda, indicando a ausência de DNA viral. Nos restantes poços observa-se uma amostra positiva para o HPV, onde as bandas inespecíficas (indicadas pelas setas cor laranja) diminuem à medida que a temperatura de *annealing* aumenta. Em contrapartida, as bandas correspondentes ao HPV, de acordo com o marcador de peso molecular (seta amarela), vão ficando cada vez mais intensas. A temperatura de *annealing* ideal para estes primers foi 50 °C, onde se destaca uma única banda na região correspondente ao genótipo do HPV (≈150 bp), com a maior intensidade (destacada a branco). *Ladder*- marcador de peso molecular; NTC- do inglês “No Template Control” (controlo sem DNA).

Para testar os primers MY09/MY11 foi utilizada a mesma amostra de validação do novo kit positiva para o HPV. Os resultados da amplificação foram também observados por eletroforese em gel de agarose, sendo os critérios para a escolha da melhor temperatura de *annealing* idênticos aos utilizados para os primers GP5/GP6, tendo sido a temperatura de 55°C a mais adequada.

A otimização da quantidade de reagentes usados no kit QIAGEN ® Multiplex PCR, foi ajustada a quantidade de *primer* para cada conjunto de primers GP5/GP6 e MY09/MY11, com o objetivo de diminuir a quantidade do dímero de *primer*. A Figura 11 ilustra claramente como é que a redução para metade da quantidade dos primers GP5/GP6 na mistura de reação influencia a eficiência da PCR: a Figura 11 B), apresenta uma banda correspondente ao DNA viral (seta laranja), claramente visível, enquanto a Figura 11 A), que utilizou a quantidade padrão de primers, não apresenta essa banda correspondente à amplificação do DNA viral.

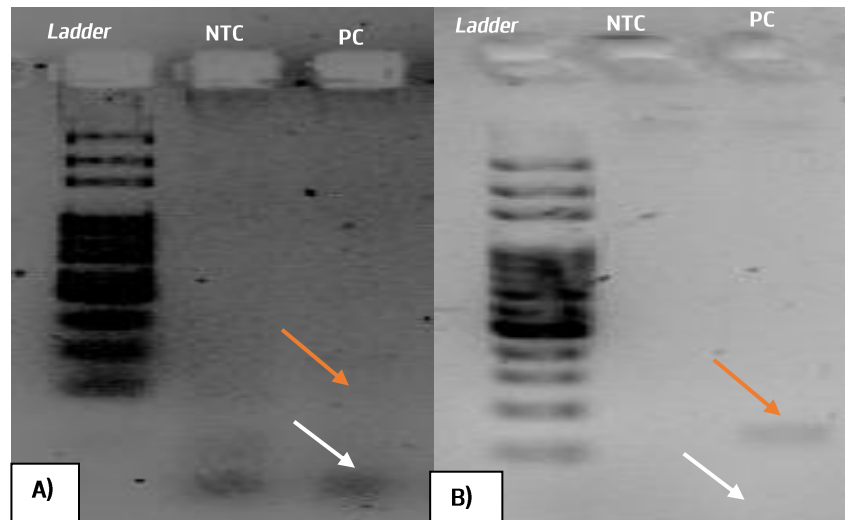


Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose a 2% demonstrando a influência da diminuição da quantidade dos *primers* GP5/GP6 na amplificação do DNA do HPV por PCR convencional. A) A mistura de reação contém a quantidade padrão de *primers* (0.75 μ L, 10 μ mol). A adição de uma amostra positiva para o HPV, no terceiro poço, revela uma elevada quantidade de dímero de *primer* (seta branca), enquanto a banda correspondente ao HPV (\approx 150 bp) não é observável (seta laranja). B) A mistura de reação contém metade da quantidade de *primers* (0.35 μ L, 10 μ mol). Para a mesma amostra positiva para o HPV no terceiro poço, não se observa a banda correspondente ao dímero de *primer* (seta branca), enquanto a banda correspondente ao HPV (seta laranja) é visível. *Ladder*- marcador de peso molecular; NTC- do inglês “No Template Control” (um controlo sem DNA); PC- do inglês “Positive Control” (controlo positivo para o HPV).

Na Figura 12, é possível observar que, ao contrário do observado com os *primers* GP5/GP6, com os *primers* MY09/MY11, a presença da banda correspondente ao dímero de *primer* não impede a visualização da banda correspondente ao HPV. Comparando as figuras A) e B), é possível verificar que a redução da quantidade de *primer* para 75%, leva a que a banda correspondente ao dímero de *primer* fique menos intensa, enquanto a banda correspondente ao HPV permanece visível em ambas as condições.

Após a otimização das condições da PCR convencional, foram testadas as amostras com resultados inconclusivos e inválidos obtidos pelo método da PCR em tempo real (n = 12). Os resultados da amplificação das 12 amostras pelo método da PCR convencional otimizado com os pares de *primers* GP5/GP6 e MY09/MY11 foram analisados através da eletroforese em gel de agarose (Figura 13).

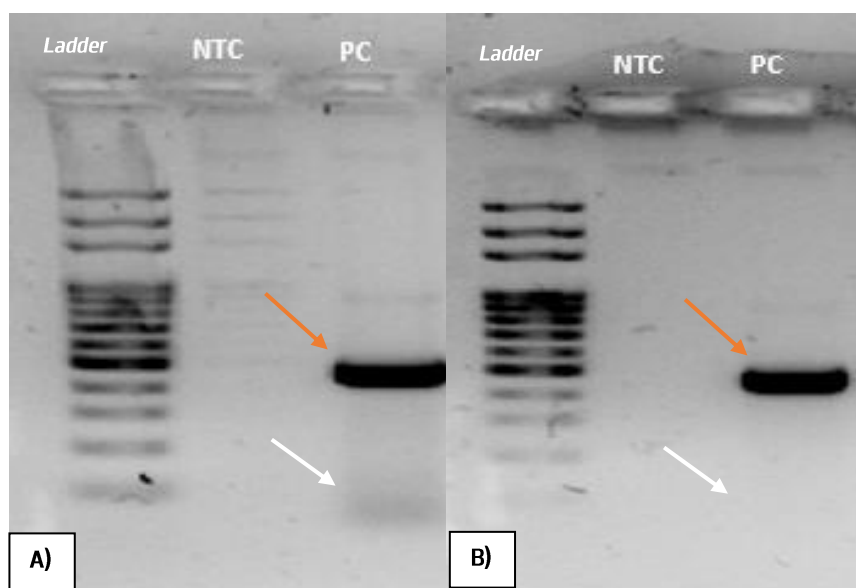


Figura 12– Eletroforese em gel de agarose a 2% demonstrando a influência da diminuição da quantidade dos *primers* MY09/MY11 na amplificação do DNA do HPV por PCR convencional. **A)** A mistura de reação contém a quantidade padrão de *primer* (0.75 μ L, 10 μ mol). A adição de uma amostra positiva para o HPV, no terceiro poço, revela a presença de algum dímero de *primer* (seta branca) e a banda correspondente ao HPV (\approx 450 bp) também está presente (seta laranja). **B)** A mistura de reação contém 75% da quantidade de *primer* (0.57 μ L, 10 μ mol). Com a mesma amostra positiva para o HPV no terceiro poço, já não é visível a banda correspondente ao dímero de *primer* (seta branca) e continua a ser visível a banda correspondente ao HPV (seta laranja). *Ladder*- marcador de peso molecular; NTC- do inglês “No Template Control” (um controlo sem DNA); PC- “Positive Control” (controlo positivo para o HPV).

As amostras com os resultados previamente classificados como inconclusivos ou inválidos pelo método da PCR em tempo real, mostraram resultados válidos pela PCR convencional otimizada (Figura 13). Em todas as eletroforeses, foi observado um perfil semelhante ao da Figura 13 A): o controlo negativo não apresentou qualquer amplificação e os controlos positivos apresentaram uma banda na zona correspondente ao tamanho esperado do fragmento amplificado do HPV (\approx 150 bp para os *primers* GP5/GP6 e \approx 450 bp para os *primers* MY09/MY11) (setas azuis). As amostras que apresentaram apenas bandas nessas regiões específicas foram consideradas positivas, com um total de 10 amostras positivas (83%) e 2 amostras negativas (17%). Das 10 amostras positivas, em 7 (70%) foi observado um resultado positivo com os *primers* GP5/GP6, em 5 (50%) foi observado um resultado positivo com os *primers* MY09/MY11, e em 2 amostras (B115 e B171) (20%) os resultados foram concordantes entre ambos os pares de *primers*.

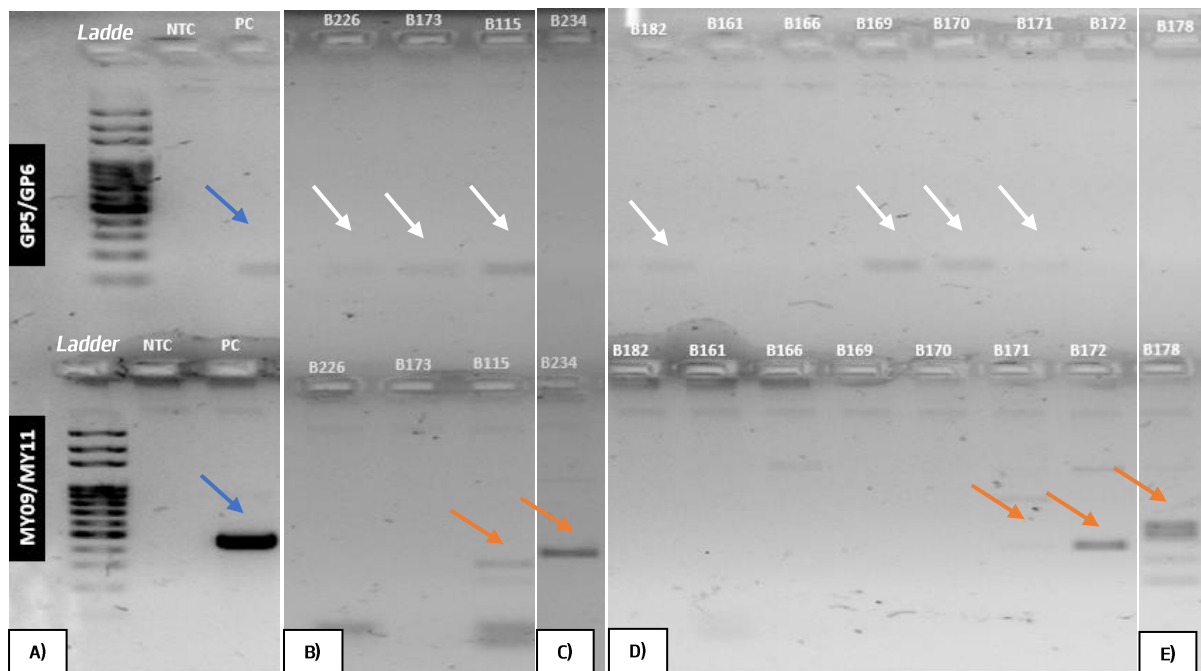


Figura 13- Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de amplificação de amostras previamente classificadas como inconclusivas e inválidas pelo método da PCR em tempo real. A amplificação foi realizada pelo método da PCR convencional otimizado com os pares de *primers* GP5/GP6 e MY09/MY11. Em cada eletroforese em gel de agarose foram incluídos o marcador de peso molecular (*Ladder*), o NTC e o PC de forma a validar os resultados e todos apresentavam um perfil semelhante ao da imagem A). **A)** Eletroforese em gel de agarose com *Ladder*, NTC e PC. Os controlos positivos apresentam uma banda tal como era esperado (seta azul). **B)** Eletroforese em gel de agarose com 3 amostras de biópsias da próstata, utilizando os dois conjuntos de *primers*. Para o conjunto de *primers* GP5/GP6 foram consideradas positivas 3 amostras (setas brancas) e para o conjunto de *primers* MY09/MY11 foi considerada apenas 1 amostra positiva (seta laranja), estando em concordância com o conjunto de *primers* anterior (B115). **C)** Eletroforese em gel de agarose com 1 amostra de biópsia da próstata com os dois conjuntos de *primers*. Esta amostra apenas foi considerada positiva para o conjunto de *primers* MY09/MY11 (seta laranja). **D)** Eletroforese em gel de agarose com 7 amostras de biópsias da próstata com os dois conjuntos de *primers*. Para o conjunto de *primers* GP5/GP6 foram consideradas positivas 4 amostras (setas brancas) e para o conjunto de *primers* MY09/MY11 foram consideradas apenas 2 amostras positivas (setas laranjas), estando uma delas em concordância com o conjunto de *primers* anterior (B171). **E)** Eletroforese em gel de agarose com 1 amostra de biópsia da próstata com os dois conjuntos de *primers*. Esta amostra apenas foi considerada positiva para o conjunto de *primers* MY09/MY11 (seta laranja). *Ladder*- marcador de peso molecular; NTC- do inglês “No Template Control” (um controlo sem DNA); PC- do inglês “Positive Control” (controlo positivo para o HPV).

As amostras positivas (n = 10), foram sequenciadas pelo método de Sanger, tendo sido obtido um eletroferograma para cada amostra analisada, que representa graficamente a sequência de DNA- uma série de picos de quatro cores correspondente a cada cor uma das quatro bases azotadas (A, T, C e G) (Figura 14).

Das 10 amostras sequenciadas, apenas 9 (90%) foram comparadas com as sequências do GenBank, através do programa BLAST no site do NCBI, uma vez que uma amostra apresentou um eletroferograma com múltiplos picos sobrepostos, facto que impossibilitou a leitura da sequência, tendo um resultado inconclusivo para a detecção do HPV. Entre as 9 sequências comparadas com o GenBank, 8 (89%) foram concordantes com sequências de genótipos do HPV (positivas), sendo 6 (75%) correspondentes a genótipos de alto risco e 2 (25%) a genótipos de baixo risco. Uma amostra (11%) foi concordante com uma sequência de um gene humano, sendo classificada como negativa para o HPV.

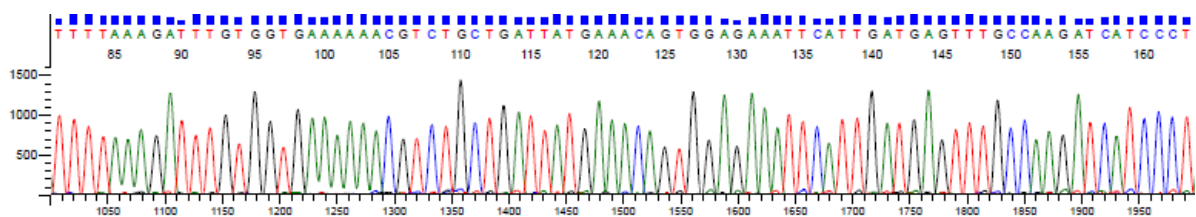


Figura 14- Eletroferograma resultante da sequenciação de Sanger analisado com o software Sequencing Analysis 7 v7.1. Este eletroferograma representa a sequência de picos gerada pela leitura de nucleótidos de uma amostra positiva para o HPV. As quatro cores correspondem a diferentes bases de nucleótidos: adenina (A) a verde, citosina (C) a azul, guanina (G) a preto e timina (T) a vermelho. A sequência de picos reflete a ordem das bases no fragmento de DNA amplificado, onde a altura e a nitidez dos picos indicam a qualidade da leitura. Eventuais sobreposições ou picos menores podem indicar ruído ou falhas na leitura.

De referir que todas as amostras amplificadas com os *primers* GP5/GP6 (n = 7) (100 %) apresentaram concordância com sequências de genótipos de HPV, o que não se verificou com os *primers* MY09/MY11 (n=5), uma vez que 3 (60%) apresentaram concordância com genes humanos (negativas), 1 (20%) apresentou concordância com a sequência de um genótipo de HPV e outra (20%) foi inconclusiva devido a apresentar um eletroferograma com múltiplos picos.

No global, considerando os resultados da PCR em tempo real válidos e os resultados obtidos pela sequenciação de Sanger, das 188 amostras analisadas, 171 (91%) foram negativas para a detecção do HPV, 15 (8%) foram positivas para o HPV, 1 (0,5%) teve um resultado inconclusivo e 1 (0,5%) um resultado inválido. Dentro das 15 amostras positivas, 13 (87%) apresentaram infeções simples e 2 (13%) infeções múltiplas. Relativamente às infeções simples (n=13), 11 (85%) apresentaram infeção por genótipos de alto risco, 1 (7,5%) por um genótipo de médio risco e 1 (7,5%) por um genótipo de baixo risco. Nas infeções múltiplas, uma amostra (50%) apresentou a infeção por um genótipo de alto risco e um outro de baixo risco, enquanto a outra amostra (50%) apresentava infeção por dois genótipos de alto risco.

A Figura 15 permite comparar os resultados obtidos com a utilização de uma tecnologia (PCR em tempo real) em relação ao uso combinado de duas tecnologias (PCR em tempo real e sequenciação de Sanger).

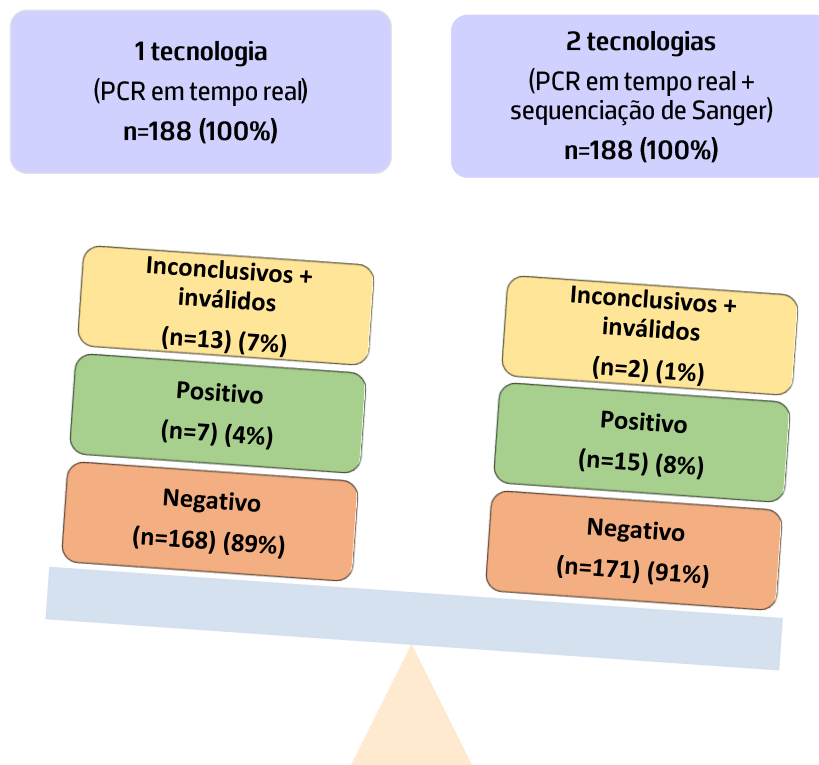


Figura 15- Comparação de resultados obtidos por uma tecnologia (PCR em tempo real) em relação ao uso combinado de duas tecnologias (PCR em tempo real e sequenciação de Sanger). A figura compara os resultados obtidos em 188 amostras de tecido prostático usando uma tecnologia e duas tecnologias. Com uma tecnologia, 7% das amostras foram inconclusivas e inválidas, 4% foram positivas e 89% negativas. Quando foram utilizadas duas tecnologias, a percentagem de resultados inconclusivos e inválidos diminuiu para 1%, enquanto a percentagem de resultados positivos aumentou para 8% e de negativos para 91%. Estes resultados evidenciam uma maior precisão com a combinação de duas tecnologias, conforme ilustrado pela balança.

3.4. Estudo da associação da infecção por HPV e CaP

Para investigar a associação entre a infecção pelo HPV e o CaP, foram analisados os resultados obtidos através da PCR em tempo real e sequenciação de Sanger com as amostras de DNA proveniente de tecido prostático congelado conjuntamente com alguns dados

clínicopatológicos dos pacientes, nomeadamente a idade e o diagnóstico- presença de CaP ou ausência de CaP.

As amostras em estudo são reativas a 188 pacientes com suspeita de CaP, tendo sido diagnosticado CaP em 144 (76,6%) pacientes, não tendo sido diagnosticado esta patologia em 44 (23,4%) pacientes.

As idades dos pacientes variaram entre os 47 e os 98 anos, com um valor médio aproximado de 68 anos (68,32). As idades dos pacientes foram categorizadas em três grupos com base nas incidências do CaP em Portugal, segundo o Registo Oncológico Nacional no ano de 2020 (44): menos de 65 anos; de 65 a 74 anos; e 75 anos ou mais. A distribuição dos pacientes por estes três grupos etários mediante a sua idade, revelou uma distribuição de 66 indivíduos (35,1%) no grupo com menos de 65 anos; 83 indivíduos (44,1%) no grupo entre os 65 e os 74 anos; e 39 indivíduos (20,7%) no grupo com 75 anos ou mais. A distribuição dos pacientes mediante o diagnóstico de CaP e as variáveis idades, resultado genotipagem, tipo de infeção e genótipo detetado está apresentada na Tabela 8.

Ao relacionar a idade com o CaP (zona azul, Tabela 8) é possível verificar que a maioria dos indivíduos mais velhos apresenta doença: 79,5% dos doentes entre 65 e 74 anos e 82,1% dos doentes com idade superior a 75 anos.

Na análise da relação entre os resultados da genotipagem e o CaP (zona vermelha, Tabela 8), verifica-se que, dentro dos casos positivos para o HPV, existe uma maior percentagem de casos com CaP (66,7%) em comparação com aqueles que não têm CaP (33,3%). Além disso, nos casos negativos para o HPV, a percentagem de indivíduos com CaP é superior (77,2%) em relação aos que não têm CaP (22,8%).

Ao associar o tipo de infeção com o CaP (zona verde, Tabela 8), é possível verificar que 100 % dos casos com infeções múltiplas por HPV apresentam CaP. A percentagem de infeções simples por HPV é maior em doentes com CaP (61,5%) do que naqueles sem a doença (38,5%). Em relação ao genótipo detetado (zona amarela, Tabela 8), a maioria dos casos sem genótipo detetado (77,5%) ocorre em indivíduos com CaP. Além disso, 63,6% dos casos com genótipos de HPV de alto risco estão associados ao CaP, com cerca de 56% desses casos correspondendo a infeções por HPV-18.

Tabela 8- Relação entre o CaP e as variáveis: idade; resultado genotipagem; tipo de infecção e genótipo detetado

	CaP			
	Sim		Não	
Idade	n	(%)	n	(%)
< 65 anos	46	(69,7)	20	(30,3)
65 – 74 anos	66	(79,5)	17	(20,5)
≥ 75 anos	32	(82,1)	7	(17,9)
Resultado genotipagem				
Negativo	132	(77,2)	39	(22,8)
Positivo	10	(66,7)	5	(33,3)
Inconclusivo	1	(100)	0	(0)
Inválido	1	(100)	0	(0)
Tipo de infecção				
Sem infecção	134	(77,5)	39	(22,5)
Simple	8	(61,5)	5	(38,5)
Múltipla	2	(100)	0	(0)
Genótipo detetado				
Nenhum	134	(77,5)	39	(22,5)
HPV alto-risco	7	(63,6)	4	(36,4)
HPV médio risco	0	(0)	1	(100)
HPV baixo risco	1	(100)	0	(0)
2 genótipos alto risco	1	(100)	0	(0)
2 genótipos: baixo risco+ alto risco	1	(100)	0	(0)

Para investigar uma possível associação entre a infecção por HPV e a idade, foram efetuados dois métodos estatísticos: o teste do qui-quadrado de Pearson e a análise de regressão logística. O teste do qui-quadrado de Pearson não mostrou qualquer associação entre a infecção por HPV e a idade ($p = 0,44$), resultado que mostra que a distribuição de indivíduos com e sem infecção pelo HPV é semelhante nos diferentes grupos etários. A análise de regressão logística também não evidenciou uma associação estatisticamente significativa entre a infecção por HPV e a idade ($p = 0,704$ para 65–74 anos e $p = 0,395$ para ≥ 75 anos), indicando que a idade não influencia significativamente a probabilidade de infecção pelo HPV.

Foi ainda realizada uma análise para averiguar a relação entre infecção e CaP por grupo etário (Figura 16).

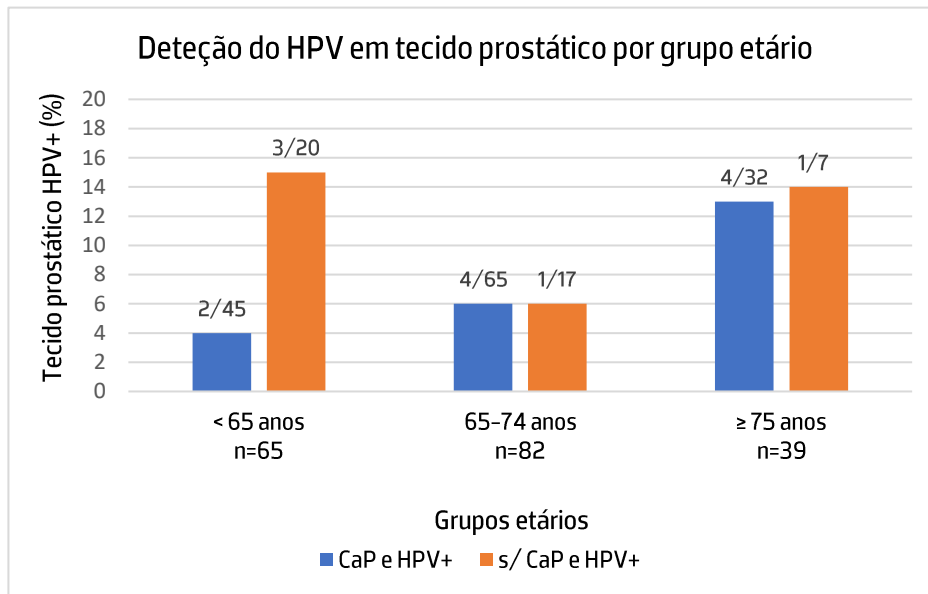


Figura 16– Relação entre a detecção de HPV em tecido prostático por grupos etários em indivíduos com e sem CaP. O gráfico compara a detecção de HPV no tecido prostático entre indivíduos com e sem CaP em três grupos etários: <65 anos (4,4% CaP e 15% sem CaP), 65-74 anos (6,15% CaP e 5,88% sem CaP) e ≥75 anos (12,5% CaP e 14,3% sem CaP).

Uma análise da Figura 16 mostra que não existe qualquer tipo de associação entre infecção pelo HPV e CaP nos pacientes dos grupos etários de 65 a 74 anos ($p=0,967$) ou com mais de 75 anos ($p=0,898$). Relativamente ao grupo etário com menos de 65 anos a frequência de pacientes sem CaP e com infecção pelo HPV é muito superior (15%) comparativamente à de pacientes com CaP e com infecção pelo HPV (4,4%). Contudo esta diferença encontrada não é estatisticamente significativa ($p=0,163$).

4. Discussão

4.1. Extração e quantificação do DNA do HPV

No presente estudo, foram utilizados dois métodos de extração de DNA distintos: o método automatizado Maxwell®- RSC DNA FFPE e o método manual QIAamp DNA Micro (Qiagen). A utilização do método automatizado para as 32 amostras de DNA provenientes de tecido FFPE e de células em citologia em meio líquido demonstrou uma concentração média de DNA de 46,66 ng/μL. Este resultado reflete não apenas a eficiência desse método, mas também a sua capacidade de minimizar erros manuais, resultando em uma recuperação mais confiável do DNA, especialmente em amostras de tecido FFPE, que geralmente apresentam melhor preservação da integridade do material genético ao longo do tempo.(78) Em contraste, as 188 amostras de tecido prostático congelado, extraídas manualmente, apresentaram uma concentração média de DNA significativamente inferior, de apenas 17,58 ng/μL. Esta redução na concentração de DNA reflete as limitações da extração manual, que é mais suscetível a perdas de DNA, especialmente em tecidos congelados, onde as condições de armazenamento podem ter impacto na integridade da amostra. Além disso, a redução na concentração de DNA pode explicar os resultados inconclusivos e inválidos neste conjunto de amostras durante a PCR em tempo real, uma vez que esta técnica possui um limite de detecção mais elevado e não é tão sensível quanto o método CLART® HPV 4. Com uma menor quantidade de DNA disponível, a amplificação do DNA viral torna-se ainda mais difícil, resultando em desafios significativos na obtenção de resultados confiáveis.(79)

Adicionalmente, apenas 34% das amostras de DNA utilizadas para a implementação e validação do novo kit apresentaram concentrações superiores a 50 ng/μL, em comparação com o 1% das amostras de tecido prostático congelado, reforçando a hipótese de que amostras de tecido FFPE, apesar de processadas preservam melhor a integridade do DNA do que as amostras de tecido congelado.(79)

A otimização dos métodos de extração é crucial para obter concentrações adequadas de DNA, uma vez que amostras com DNA em maior quantidade são fundamentais para análises moleculares precisas, como PCR ou sequenciação, onde a sensibilidade e a confiabilidade dos resultados dependem diretamente da qualidade da amostra.

4.2. Implementação e validação do kit de amplificação de DNA do HPV baseado em PCR em tempo real

O primeiro objetivo deste estudo consistiu em implementar um novo kit de amplificação de DNA do HPV baseado em PCR em tempo real da Mospire® e validar a sua eficiência através da comparação dos resultados obtidos com os obtidos pelo do método CLART® HPV 4 para as mesmas amostras. A análise dos dados revelou uma alta taxa de concordância (88%) entre os dois métodos, no entanto, a presença de 4 amostras com resultado não concordantes destaca a importância de considerar possíveis limitações de cada metodologia.

Dentro das amostras com resultados não concordantes, duas revelaram a presença de um novo genótipo de HPV que não foi detetado pelo método CLART® HPV 4, enquanto as outras duas, apresentaram resultados negativos para o HPV, apesar do método CLART® HPV 4 indicar a presença de vírus. De acordo com a literatura, a maioria dos protocolos disponíveis de genotipagem de HPV utiliza *primers* degenerados e/ou de consenso para a amplificação da região L1 (o caso da tecnologia CLART® HPV 4), a região E1, ou as regiões E6/E7 do HPV (o caso da metodologia Mospire®). Embora, a utilização de *primers* degenerados e/ou de consenso apresente a vantagem de permitir a deteção de um grande espectro de genótipos de HPV através de uma única PCR, por outro lado, essa abordagem pode ser menos eficaz na identificação de genótipos específicos, especialmente em casos de infeções múltiplas. (89) O facto de as amostras não concordantes apresentarem infeções por múltiplos genótipos de HPV pode contribuir para essa dificuldade. No caso da metodologia CLART® HPV 4, a amplificação ocorre numa única reação, o que pode levar a uma competição maior entre os *primers* e, conseqüentemente, à não deteção de alguns genótipos. Em contraste, a metodologia Mospire® distribui os *primers* em oito misturas de reação, o que pode permitir uma amplificação mais eficaz.

Relativamente às amostras que apresentaram um resultado negativo para o HPV pelo método da PCR em tempo real, é importante considerar que isso pode indicar que o número de cópias virais está abaixo do limite de deteção do kit utilizado. O kit CLART® HPV 4 apresenta um limite de deteção de 200 cópias/mL, enquanto o novo kit da Mospire® estabelece um limite de 500 cópias/mL. Essa diferença nos limites de deteção pode contribuir para as discrepâncias observadas nos resultados. Os resultados obtidos com os controlos positivo e negativo confirmam a eficiência e a fiabilidade do novo kit de PCR em tempo real. O controlo negativo mostrou amplificação exclusivamente para o fluorocromo que marca o controlo interno, validando a ausência de contaminação durante o processo de deteção do HPV. Este aspeto é

fundamental para assegurar a integridade dos resultados obtidos em amostras clínicas, uma vez que a contaminação pode levar a resultados falsos positivos e comprometer a interpretação clínica. Por outro lado, o controlo positivo apresentou amplificação para todos os genótipos de HPV, além do controlo interno, corroborando a funcionalidade e precisão do novo método na identificação de múltiplos genótipos de HPV. Estes resultados demonstram a utilidade do método tanto em contextos de pesquisa quanto na aplicação clínica, assegurando uma deteção sensível e específica do DNA viral. Além disso, os resultados dos controlos incluídos no kit demonstram ainda que o método de extração utilizado Maxwell® RSC DNA FFPE não apenas preservou a qualidade do DNA, mas também assegurou uma deteção precisa do HPV. A preservação adequada do DNA é crucial para a eficácia de técnicas moleculares, uma vez que a degradação do material genético pode afetar negativamente a sensibilidade e a especificidade dos métodos de amplificação.(80)

4.3. Pesquisa do HPV em tecidos prostático por PCR em tempo real

O segundo objetivo do estudo consistiu em investigar a presença do HPV, utilizando o novo kit de amplificação de DNA do HPV da Mospire® baseado em PCR em tempo real em amostras de indivíduos com suspeita de CaP. Contudo, os resultados para este grupo de amostras não foram tão claros quanto os obtidos para as amostras usadas na implementação e validação do novo kit, apresentando resultados inconclusivos e inválidos.

Nos casos de amostras com resultados inconclusivos, a curva de amplificação correspondente ao controlo interno (marcada com o fluorocromo Cy5) amplificou corretamente, evidenciando a presença de DNA humano na reação. No entanto, as curvas referentes aos genótipos de HPV exibiram apenas uma leve elevação acima da linha de base, sem apresentar a forma típica de amplificação em curva tipo-S. Este padrão pode ser atribuído a diversos fatores, incluindo degradação da amostra, baixo número de cópias virais e selagem inadequada.(79,81) A degradação do DNA, especialmente em amostras extraídas de tecidos congelados, pode ocorrer devido a múltiplos ciclos de congelação e descongelação, impactando a integridade do DNA e a eficiência da amplificação pela PCR.(79) Além disso, o limite de deteção do kit Mospire® é de 500 cópias/mL. Em alguns casos, a carga viral pode ter estado próxima desse limite, resultando em ampliações imperfeitas que não permitiram uma análise conclusiva. A localização das amostras inconclusivas no perímetro da placa também pode ter contribuído, uma vez que a evaporação durante a PCR pode afetar negativamente a reação.(81) A utilização de consumíveis

adequados para a selagem das placas é, portanto, recomendada para garantir a integridade das reações.(81).

Nos casos de amostras com resultados inválidos, não se observou qualquer amplificação, nem mesmo do controlo interno. Tal situação sugere a ausência de DNA humano ou viral em quantidades suficientes para deteção, ou a presença de falhas técnicas. As causas mais prováveis para os resultados obtidos estão associadas principalmente à quantidade insuficiente de DNA e à sensibilidade do método utilizado.(82) O facto de a espectrofotometria ter indicado uma baixa concentração de DNA sugere que a amostra não continha DNA em quantidade suficiente para permitir uma deteção eficaz. Isto é fundamental, uma vez que a PCR requer uma quantidade mínima de DNA para amplificar e detetar a sequência alvo de forma adequada. Adicionalmente, a sensibilidade do método pode ter sido um fator determinante. Como o kit CLART® HPV 4 apresenta um limite de deteção de 200 cópias/mL, enquanto o novo kit da Mospire® baseado em PCR em tempo real estabelece um limite de 500 cópias/mL, é possível que o novo kit não tenha sido capaz de detetar pequenas quantidades de DNA presentes na amostra. Ou seja, o método da PCR em tempo real necessita de uma maior quantidade de DNA para identificar o alvo de forma eficiente, enquanto o método CLART® HPV 4, com maior sensibilidade, poderia detetar o DNA em concentrações mais baixas. (83)

Devido à insuficiência da amostra nos casos em que os resultados foram inconclusivos ou inválidos, optou-se por realizar a PCR convencional seguida de sequenciação de Sanger. Esta abordagem foi adotada, uma vez que a quantidade de amostra disponível não permitia a repetição do teste com o kit Mospire® baseado em PCR em tempo real, que requeria um mínimo de 40 µL de amostra de DNA para cada análise. A sequenciação de Sanger oferece uma validação adicional ao possibilitar a confirmação da presença de genótipos virais, mesmo em situações em que a quantidade de amostra é limitada, assegurando a robustez dos resultados obtidos.

4.3.1. Análise das amostras com resultados inconclusivos e inválidos

Para uma PCR eficiente, é fundamental considerar diversos fatores, incluindo a seleção dos *primers*, a temperatura de *annealing* e as concentrações dos *primers* na mistura de reação. Neste estudo, foram utilizados os pares de *primers* GP5/GP6 e MY09/MY11, que amplificam a região L1 do genoma do HPV. Estes *primers* são amplamente reconhecidos pela sua eficácia na deteção de um amplo conjunto de genótipos de HPV em contextos clínicos.(84)

Para otimizar as condições da PCR, foi determinada a melhor temperatura de *annealing* para cada par de *primers*, através de um teste de gradiente no termociclador (*Bio-rad*), tendo por base a T_m dos *primers*. Este parâmetro é crítico, uma vez que variações de 1°C a 2°C podem impactar significativamente a especificidade da amplificação. A temperatura de *annealing* ideal, que geralmente varia entre 55°C e 72°C, deve ser ajustada, tendo em consideração a composição nucleotídica dos *primers* e o seu comprimento/tamanho. Importante realçar que os pares de bases G–C formam três ligações de hidrogénio, enquanto A–T formam apenas duas, o que implica que um maior teor de GC resulta numa T_m mais elevada e, conseqüentemente, requer temperaturas de *annealing* superiores.(85)

No presente estudo, a temperatura de *annealing* ideal foi definida em 50°C para o par de *primers* GP5/GP6 e 55°C para o par de *primers* MY09/MY11. Estas temperaturas foram selecionadas pois, a essas temperaturas, ambos os pares apresentaram bandas únicas no gel de agarose, indicando uma maior especificidade na amplificação do produto desejado. Além disso, as bandas obtidas mostraram uma intensidade superior em comparação às amostras amplificadas a outras temperaturas, sugerindo uma PCR mais eficiente. No entanto, o par de *primers* GP5/GP6 demonstrou ser 100% complementar apenas para alguns génotipos de HPV. Para contornar esta limitação, optou-se por uma temperatura de *annealing* mais baixa, que, embora possa reduzir a especificidade, facilita a ligação do *primer* a outros génotipos. Por outro lado, o par de *primers* MY09/MY11, sendo um par de *primers* degenerados, que contêm uma mistura de nucleótidos, não necessitam de uma temperatura de *annealing* tão baixa.(86,87) Esta não complementaridade total dos *primers* GP5/GP6 com os génotipos de HPV, pode explicar a discrepância observada, onde uma amostra amplificada com este par de *primers* resultou negativa, enquanto com o par de *primers* MY09/MY11 foi positiva. Adicionalmente, artefactos de PCR, como dímeros de *primers*, podem ocorrer em concentrações elevadas de *primers* ou em ciclos excessivos, gerando produtos de DNA de baixo peso molecular. Estes dímeros de *primers* podem competir com o DNA viral pela enzima DNA polimerase, reduzindo a eficiência da amplificação.(88) Neste estudo verificou-se a existência desse artefacto, e para aumentar a eficiência da reacção, a quantidade do par de *primers* GP5/GP6 na mistura de reacção foi reduzida para 50%, enquanto a do par de *primers* MY09/MY11 foi ajustada para 75%. Como demonstrado nas Figuras 11 e 12, a diminuição da quantidade de *primer* resultou na eliminação do artefacto e na amplificação do DNA viral. A diferença na quantidade de par de *primers* a adicionar em cada mistura de reacção (50%–GP5/GP6 e 75%–MY09/MY11) teve por base a inibição da reacção de

PCR no par GP5/GP6 e o tamanho do produto amplificado por cada par de *primers*, pois o par MY09/MY11 amplifica um produto muito maior relativamente ao par GP5/GP6.

O tamanho do produto amplificado também é um fator importante a considerar na PCR, pois a eficiência da amplificação é inversamente proporcional ao tamanho do produto: produtos menores tendem a ser amplificados com maior eficiência. (58) Isso pode justificar o maior número de amostras positivas obtidas com o par de *primers* GP5/GP6 (n=7) em comparação com o par de *primers* MY09/MY11 (n=1).(89) O uso de *primers* degenerados, embora amplie a gama de genótipos detetáveis, pode também resultar numa sensibilidade reduzida para a deteção de genótipos específicos, devido à inserção aleatória de nucleótidos que pode afetar a distribuição equilibrada dos *primers*. Este fenómeno pode levar ao aparecimento de múltiplas bandas no gel de agarose e à amplificação de fragmentos de DNA humano em vez de DNA viral. (75) Apesar das suas limitações, ambos os pares de *primers*, GP5/GP6 e MY09/MY11, são métodos complementares que contribuem para um diagnóstico mais preciso.

No final da experiência, isto é, da sequenciação, apenas duas amostras apresentaram resultados indesejáveis: uma inconclusiva e outra inválida. A amostra inconclusiva resultou em múltiplos picos sobrepostos na análise do eletroferograma da sequenciação de Sanger. Quando a quantidade de amostra é suficiente, recomenda-se repetir a eletroforese em gel de agarose sob condições diferentes para separar bandas com pesos moleculares aproximados, permitindo o corte, purificação e sequenciação de cada banda. Para tal, podem ser ajustadas a concentração de agarose no gel, a potência elétrica aplicada durante a eletroforese, assim como o tempo de exposição do gel à corrente elétrica, permitindo uma melhor separação e resolução das bandas. Na amostra considerada inválida, não se observou amplificação do controlo interno, utilizando o kit Mospire®. A limitação da quantidade de material biológico nas amostras inconclusiva e inválida restringiu a realização de análises adicionais. No caso da amostra inválida, a ausência de DNA suficiente impossibilitou tanto a repetição do teste com o mesmo kit quanto a utilização de técnicas alternativas, como a PCR convencional seguida de sequenciação de Sanger. Da mesma forma, para a amostra inconclusiva, a insuficiência de amostra inviabilizou a repetição da PCR convencional e da sequenciação de Sanger. Além disso, não foi possível realizar a eletroforese em gel de agarose sob condições alternativas, como a alteração do tempo de corrida ou a modificação da concentração do gel, que poderiam facilitar a separação de bandas com pesos moleculares semelhantes e permitir o corte e a purificação das bandas para posterior

sequenciação. Assim, os resultados finais para essas duas amostras foram considerados inconclusivos e inválidos.

A comparação dos resultados obtidos com a utilização isolada da PCR em tempo real em relação à combinação desta técnica com a sequenciação de Sanger revela uma melhoria significativa na eficácia da detecção do HPV. Ao aplicar as duas metodologias, verificou-se um aumento no número de resultados positivos e negativos, o que indica que a combinação de abordagens moleculares diferentes permite uma detecção mais abrangente e precisa dos genótipos de HPV presentes nas amostras analisadas. A redução observada de resultados inconclusivos e inválidos ao aplicar as duas técnicas sugere que a sequenciação de Sanger complementa a PCR em tempo real, permite uma validação adicional dos dados obtidos. Portanto, a implementação de técnicas combinadas não apenas melhora a taxa de detecção, mas também fortalece a interpretação dos resultados, promovendo uma abordagem mais robusta para o diagnóstico do HPV. Além disso, a utilização de múltiplas tecnologias de detecção oferece uma resolução superior em casos de infecções complexas, onde a coexistência de múltiplos genótipos de HPV pode interferir na precisão dos resultados. A integração da PCR em tempo real e da sequenciação de Sanger representa, portanto, um avanço significativo na pesquisa e no diagnóstico clínico do HPV, contribuindo para melhores estratégias de monitorização e tratamento das infecções associadas a este vírus.

4.4. Estudo da associação da infecção por HPV e CaP

O HPV é amplamente reconhecido pela sua associação com vários tipos de cancro, em especial com o cancro do colo do útero. Contudo, a sua relação com o CaP ainda permanece indefinida. O primeiro estudo a estabelecer uma ligação entre o HPV e o CaP foi realizado por McNicol e Dodd em 1990, que identificaram os tipos 16 e 18 em tecido prostático tumoral.⁽⁹⁰⁾ Desde então, diversas investigações foram realizadas para entender essa associação.

Embora alguns estudos não tenham encontrado uma associação significativa entre a infecção pelo HPV e o desenvolvimento do CaP ^(91,92), dada a prevalência semelhante de HPV de alto risco em tecidos benignos e malignos da próstata, outro estudo defendeu que o HPV pode desempenhar um papel importante nas fases iniciais da oncogénese prostática. O conceito de "toca e foge" mencionado no estudo refere-se à hipótese de que as células infetadas pelo HPV podem adquirir temporariamente o genoma viral nas fases iniciais do desenvolvimento do cancro, sendo esse genoma difícil de detetar em fases mais avançadas. Esta hipótese é apoiada

pela observação de uma maior expressão da proteína viral E7 em tecidos benignos, comparativamente a amostras malignas subsequentes do mesmo indivíduo. (93) A maior expressão da E7 em tecidos benignos sugere que o HPV pode interferir nos mecanismos de regulação celulares logo no início do desenvolvimento do cancro, possivelmente promovendo a resistência à apoptose nas células da próstata. Este mecanismo poderá facilitar a sobrevivência de células predispostas à transformação maligna, contribuindo para a progressão tumoral.

Whitaker *et al.* observaram a presença do HPV tanto em tecidos normais, como lesões benignas ou carcinoma da próstata, sugerindo que o HPV-18 pode ter um papel relevante na carcinogênese prostática. A presença de coilócitos, células características de infecção por HPV, em tecidos prostáticos, apoia a hipótese de que o HPV-18 influencia diretamente o desenvolvimento do CaP, possivelmente promovendo alterações displásicas e morfológicas que predisõem à transformação maligna. (94) Contudo, a questão dos genótipos de HPV mais associados ao CaP permanece controversa.(38,95) Estudos apontam discrepâncias no genótipo mais oncogénico, com alguns a relatar uma maior prevalência do HPV-16 em relação ao HPV-18 (96), enquanto outros defendem que o HPV-33 é o genótipo mais oncogénico no contexto do CaP.(95) As discrepâncias relativas aos genótipos mais oncogénicos podem ser atribuídas a fatores como variações geográficas, diferenças nas metodologias de deteção e à heterogeneidade das populações analisadas.(38) A distribuição geográfica dos genótipos de HPV sugere que fatores epidemiológicos, como prevalência regional e o comportamento da infecção, podem influenciar tanto a frequência quanto o impacto dos diferentes genótipos de HPV no desenvolvimento do CaP.(95) Estes fatores reforçam a necessidade de estudos multicêntricos, com maior rigor metodológico e abrangência populacional, para clarificar a associação entre os genótipos do HPV e a oncogénese prostática, fornecendo uma visão mais robusta e global sobre o papel do HPV no CaP.

Adicionalmente, dados mais recentes indicam que a presença de múltiplos genótipos de HPV de alto risco num único tecido prostático está associada a uma maior atividade das proteínas virais, nomeadamente E6 e E7, o que pode amplificar o risco oncogénico.(97) A co-infecção por múltiplos genótipos de HPV de alto risco no tecido prostático pode favorecer a persistência viral, induzir proliferação celular desregulada e resistência à apoptose, mecanismos centrais na oncogénese prostática, reforçando a necessidade de estudos adicionais sobre o impacto do HPV no CaP e a viabilidade de estratégias preventivas, como a vacinação.

Com base nos estudos referidos, conclui-se que a próstata é um órgão suscetível à infecção por HPV, embora a simples presença de DNA viral não seja indicativa de uma infecção ativa ou uma causalidade direta no desenvolvimento de cancro. A detecção de DNA de HPV de alto risco em tecidos prostáticos sugere que uma percentagem dos casos de CaP pode estar associada à infecção por HPV, particularmente em situações de co-infecção por múltiplos genótipos. (97) Os resultados do presente estudo corroboram esta hipótese, uma vez que 66,7% dos indivíduos positivos para HPV apresentam diagnóstico de CaP, comparativamente a 33,3% dos indivíduos sem a doença. Adicionalmente, 63,6% dos casos de CaP estão associados a genótipos de HPV de alto risco, com uma prevalência significativa de infecções por HPV-18 (56%). No entanto, a associação entre infecções múltiplas por HPV e o CaP, embora sugestiva, não é conclusiva, dado que apenas 2 das 188 amostras analisadas apresentaram infecção por mais de um genótipo de HPV. Estes dados indicam que a co-infecção pode desempenhar um papel na oncogénese prostática, mas a sua prevalência parece ser limitada. É necessário um maior número de amostras para avaliar de forma robusta a relevância das infecções múltiplas na progressão do CaP.

A análise dos resultados do presente estudo revela uma associação significativa entre a idade e a prevalência do CaP, com 79,5% dos indivíduos entre 65 e 74 anos e 82,1% dos indivíduos com mais de 75 anos diagnosticados com a doença. Estes resultados corroboram a evidência de que o risco de CaP aumenta com a idade, possivelmente devido à maior exposição a hormonas masculinas, ao acúmulo de mutações somáticas e à diminuição da eficácia do sistema imunitário, fatores que favorecem a oncogénese em homens mais velhos.(97) O gráfico apresentado (Figura 16) ilustra a detecção de HPV em tecido prostático, estratificado por grupos etários (< 65 anos, 65-74 anos e ≥ 75 anos). Observou-se que, no grupo etário inferior a 65 anos, 4,4% dos indivíduos com CaP apresentaram tecido prostático com a presença de HPV, em contraste com 15% dos indivíduos sem CaP. Na faixa etária de 65 a 74 anos, a taxa de positividade para HPV no tecido prostático foi de 6,15% nos casos de CaP e de 5,88% nos casos sem CaP. Para os indivíduos com 75 anos ou mais, a detecção de HPV em tecido prostático foi positiva em 12,5% dos casos de CaP e em 14,3% dos casos sem CaP. Estes dados indicam uma maior prevalência de HPV em indivíduos mais velhos, embora a relação com o desenvolvimento do CaP permaneça complexa, sublinhando a necessidade de estudos adicionais para elucidar o papel do HPV na oncogénese prostática. Além disso, as análises estatísticas realizadas não revelaram associações significativas entre a infecção pelo HPV e o CaP, independentemente da

idade dos indivíduos. Embora a taxa de positividade para o HPV tenha mostrado uma tendência crescente com a idade, a baixa incidência de co-infecções múltiplas e o reduzido número de casos positivos em relação ao total da amostra limitam a generalização dos resultados.

Adicionalmente, a infecção pelo HPV está frequentemente associada a comportamentos sexuais de alto risco, incluindo a prevalência de doenças sexualmente transmissíveis, o número de parceiros sexuais e a idade ao iniciar a atividade sexual. Contudo, este estudo não avaliou os comportamentos sexuais dos indivíduos, o que representa uma limitação significativa. A relação entre o HPV e esses comportamentos de risco é bem documentada na literatura (30), mas a ausência de uma avaliação neste contexto limita a capacidade de tirar conclusões robustas sobre a associação entre a infecção pelo HPV e CaP. Outras limitações incluem o tamanho da amostra, que é relativamente pequeno para análises estatísticas robustas, e a dificuldade em controlar a distribuição de microorganismos na próstata. Além disso, a presença de lesões na próstata, como a hiperplasia benigna da próstata e a prostatite, pode alterar o microambiente prostático, favorecendo a carcinogênese e o aumento de risco de CaP.(98) Portanto, estudos futuros devem aumentar o tamanho da amostra, padronizar as técnicas de colheita de amostras e expandir a análise para incluir outras lesões prostáticas, além de considerar variáveis como o comportamento sexual, para entender melhor a dinâmica entre a infecção pelo HPV e o CaP.(67)

Embora este estudo forneça poucas evidências do impacto da infecção por HPV no CaP, é crucial continuar a investigação nesta área. A crescente disponibilidade de vacinas contra o HPV pode não apenas prevenir a infecção pelo vírus, mas também potencialmente reduzir o risco de desenvolvimento do CaP. Portanto, mais estudos são necessários para esclarecer a relação entre o HPV e o CaP, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias de prevenção eficazes.

5. Conclusão

A validação do novo kit de amplificação de DNA do HPV da Mospire® revelou a sua eficácia na deteção de múltiplos genótipos, embora tenha identificado algumas limitações, como a sensibilidade reduzida para genótipos específicos. Contudo, a inclusão deste kit com técnicas complementares, como a sequenciação de Sanger, pode potencialmente melhorar essas desvantagens, aumentando a precisão e a fiabilidade dos resultados. Assim, a abordagem combinada não apenas fortalece a deteção do HPV, mas também assegura um diagnóstico mais robusto em contextos clínicos.

De salientar que o presente estudo é pioneiro em Portugal e contribui de forma significativa para a compreensão da influência da infeção pelo HPV no CaP. Embora o tamanho reduzido da amostra limite a generalização dos resultados e a identificação de relações significativas, os dados obtidos evidenciam uma associação clara entre a idade e a prevalência do CaP, indicando que o risco deste tipo de cancro aumenta com o envelhecimento. A deteção de HPV no tecido prostático sugere uma maior prevalência entre os indivíduos mais velhos; no entanto, a relação entre a infeção por HPV e o desenvolvimento do CaP permanece complexa e carece de investigação adicional. Assim, estudos futuros devem incluir uma amostra maior e expandir a análise para abranger outras lesões prostáticas, como hiperplasia benigna da próstata e prostatite, além de considerar variáveis adicionais, como o comportamento sexual. Isso permitirá uma compreensão mais aprofundada do papel do HPV na oncogénese prostática e contribuirá para o desenvolvimento de estratégias de prevenção mais eficazes.

Referências Bibliográficas

1. Yu L, Majerciak V, Zheng ZM. HPV16 and HPV18 Genome Structure, Expression, and Post-Transcriptional Regulation. Vol. 23, International Journal of Molecular Sciences. MDPI; 2022.
2. Trevisan A, Candeias JM, Thomann P, Villa LL, Franco EL, Trottier H, et al. Correlation between cervical hPV DNA detection and hPV16 seroreactivity measured with L1-only and L1+L2 viral capsid antigens. J Med Microbiol. 2020;69:960–70.
3. Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. Vol. 11, Frontiers in Bioscience. 2006.
4. Tommasino M. The biology of beta human papillomaviruses. Vol. 231, Virus Research. Elsevier B.V.; 2017. p. 128–38.
5. Harden ME, Munger K. Human papillomavirus molecular biology. Vol. 772, Mutation Research – Reviews in Mutation Research. Elsevier B.V.; 2017. p. 3–12.
6. Scarth JA, Patterson MR, Morgan EL, Macdonald A, ac uk leeds. The human papillomavirus oncoproteins: a review of the host pathways targeted on the road to transformation. Journal of General Virology. 2021;102:1540.
7. Cosper PF, Bradley S, Luo L, Kimple RJ. Biology of HPV Mediated Carcinogenesis and Tumor Progression. Vol. 31, Seminars in Radiation Oncology. W.B. Saunders; 2021. p. 265–73.
8. Gheit T. Mucosal and cutaneous human papillomavirus infections and cancer biology. Vol. 9, Frontiers in Oncology. Frontiers Media S.A.; 2019.
9. Bzhalava D, Eklund C, Dillner J. International standardization and classification of human papillomavirus types. Virology. 2015 Feb 1;476:341–4.
10. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. Virology. 2004 Jun 20;324(1):17–27.
11. de Villiers EM. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. Virology. 2013 Oct 1;445(1–2):2–10.
12. Mühr LSA, Eklund C, Dillner J. Towards quality and order in human papillomavirus research. Virology. 2018 Jun 1;519:74–6.

13. Syrjanen Anen S. Oral manifestations of human papillomavirus infections. *Eur J Oral Sci* [Internet]. 2018;126:49–66. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eos.12538>
14. McBride AA. Oncogenic human papillomaviruses. Vol. 372, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society Publishing; 2017.
15. Egawa N, Doorbar J. The low-risk papillomaviruses. Vol. 231, *Virus Research*. Elsevier B.V.; 2017. p. 119–27.
16. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol*. 2010 May 1;117(2):S5–10.
17. Araujo-Neto AP, Ferreira-Fernandes H, Amaral CMM, Santos LG, Freitas AC, Silva-Neto JC, et al. Lack of detection of human papillomavirus DNA in prostate carcinomas in patients from northeastern Brazil. *Genet Mol Biol*. 2016 Jan 1;39(1):24–9.
18. Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog*. 2009 Feb;5(2).
19. DiGiuseppe S, Luszczek W, Keiffer TR, Bienkowska-Haba M, Guion LGM, Sapp MJ. Incoming human papillomavirus type 16 genome resides in a vesicular compartment throughout mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 May 31;113(22):6289–94.
20. Ye J, Zheng L, He Y, Qi X. Human papillomavirus associated cervical lesion: pathogenesis and therapeutic interventions. Vol. 4, *MedComm*. John Wiley and Sons Inc; 2023.
21. Evande R, Rana A, Biswas-Fiss EE, Biswas SB. Protein–DNA Interactions Regulate Human Papillomavirus DNA Replication, Transcription, and Oncogenesis. Vol. 24, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
22. Fernandes JV, de Araújo JMG, Fernandes TAA de M. Biology and natural history of human papillomavirus infection. Vol. 5, *Open Access Journal of Clinical Trials*. 2013. p. 1–12.
23. Sekhar V, Reed SC, McBride AA. Interaction of the Betapapillomavirus E2 Tethering Protein with Mitotic Chromosomes. *J Virol*. 2010 Jan;84(1):543–57.
24. Della Fera AN, Warburton A, Coursey TL, Khurana S, McBride AA. Persistent human papillomavirus infection. Vol. 13, *Viruses*. MDPI AG; 2021.
25. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. Vol. 30, *Vaccine*. Elsevier Ltd; 2012.

26. Cerqueira C, Schiller JT. Papillomavirus assembly: An overview and perspectives. Vol. 231, *Virus Research*. Elsevier B.V.; 2017. p. 103–7.
27. Nyitray AG, Menezes L, Lu B, Lin HY, Smith D, Abrahamsen M, et al. Genital human papillomavirus (HPV) concordance in heterosexual couples. *Journal of Infectious Diseases*. 2012 Jul 15;206(2):202–11.
28. Burchell AN, Tellier PP, Hanley J, Coutlée F, Franco EL. Human papillomavirus infections among couples in new sexual relationships. *Epidemiology*. 2010 Jan;21(1):31–7.
29. Erickson BK, Alvarez RD, Huh WK. Human papillomavirus: What every provider should know. Vol. 208, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Mosby Inc.; 2013. p. 169–75.
30. Okunade KS. Human papillomavirus and cervical cancer. Vol. 40, *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. Taylor and Francis Ltd; 2020. p. 602–8.
31. Chidobem I, Tian F, Ogbuokiri E, Mgbodile F, Mgbodile C, Jokar TO, et al. Trends in HPV and HPV Vaccine Awareness among Gay and Bisexual Males in the U.S. *Vaccines (Basel)*. 2022 Apr 1;10(4).
32. Mcquillan G, Kruszon-Moran D, Markowitz LE, Unger ER, Paulose-Ram R. United States, 2011–2014 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). 2011;2011–4. Available from: https://www.cdc.gov/nchs/data/databriefs/db280_table.pdf#1.
33. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*. 2021 Aug 15;149(4):778–89.
34. Perfil sobre cancro por país 2023 European Cancer Inequalities Registry [Internet]. Available from: <https://www.oecd.org/termsand->
35. Wasim S, Lee SY, Kim J. Complexities of Prostate Cancer. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
36. Morka N, Norris JM, Emberton M, Kelly D. Prostate cancer and the human papilloma virus: causative association, role of vaccines, and the impact of the COVID-19 pandemic. Vol. 25, *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. Springer Nature; 2022. p. 55–7.
37. Bergengren O, Pekala KR, Matsoukas K, Fainberg J, Mungovan SF, Bratt O, et al. 2022 Update on Prostate Cancer Epidemiology and Risk Factors—A Systematic Review. Vol. 84, *European Urology*. Elsevier B.V.; 2023. p. 191–206.
38. Lin Y, Mao Q, Zheng X, Yang K, Chen H, Zhou C, et al. Human papillomavirus 16 or 18 infection and prostate cancer risk: A meta-analysis. *Ir J Med Sci*. 2011 Jun;180(2):497–503.

39. Tsydenova IA, Ibragimova MK, Tsyganov MM, Litviakov N V. Human papillomavirus and prostate cancer: systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2023 Dec 1;13(1).
40. Novembro Azul [mês de prevenção do cancro da próstata]: Liga Portuguesa Contra o Cancro [Internet]. [cited 2024 Jul 17]. Available from: <https://www.ligacontracancro.pt/novembroazul/>
41. Bento MJ, Leite P, Rita S, Revisão C, Gonçalves AF, Sousa A, et al. Título Registo Oncológico Nacional de Todos os Tumores na População Residente em Portugal, em 2020 Coordenador do Registo Oncológico Nacional.
42. Cancer Tomorrow [Internet]. [cited 2024 Jul 18]. Available from: <https://gco.iarc.who.int/tomorrow/en>
43. Palma Dos Reis J, Ferraz J, Varela J, Romão A. Diagnóstico Precoce do Carcinoma da Próstata [Internet]. Vol. 23. 2006. Available from: www.apurologia.pt
44. Cancro da Próstata – Saiba mais | Instituto da Próstata [Internet]. [cited 2024 Jul 15]. Available from: <https://www.institutodaprostata.com/pt/problemas/cancro-da-prostata>
45. Aslam HM, Shahid N, Shaikh NA, Shaikh HA, Saleem S, Mughal A. Spectrum of prostatic lesions. *Int Arch Med*. 2013;6(1).
46. Prostatite – Distúrbios geniturinários – Manuais MSD edição para profissionais [Internet]. [cited 2024 Jul 16]. Available from: <https://www.msdmanuals.com/pt-pt/profissional/dist%C3%BArbios-geniturin%C3%A1rios/doen%C3%A7a-prost%C3%A1tica-benigna/prostatite>
47. Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) – Genitourinary Disorders – MSD Manual Professional Edition [Internet]. [cited 2024 Jul 16]. Available from: <https://www.msdmanuals.com/professional/genitourinary-disorders/benign-prostate-disease/benign-prostatic-hyperplasia-bph>
48. Baig FA, Hamid A, Mirza T, Syed S. Ductal and Acinar Adenocarcinoma of Prostate: Morphological and Immunohistochemical Characterization. *Oman Med J* [Internet]. 2015 [cited 2024 Jul 17];30(3):162. Available from: [/pmc/articles/PMC4459157/](http://pmc/articles/PMC4459157/)
49. Brawer MK. Prostatic Intraepithelial Neoplasia: An Overview. *Rev Urol* [Internet]. 2005 [cited 2024 Jul 17];7(Suppl 3):S11. Available from: [/pmc/articles/PMC1477603/](http://pmc/articles/PMC1477603/)

50. Bae Y, Ito T, Iida T, Uchida K, Sekine M, Nakajima Y, et al. Intracellular propionibacterium acnes infection in glandular epithelium and stromal macrophages of the prostate with or without cancer. *PLoS One*. 2014 Feb 28;9(2).
51. Cavarretta I, Ferrarese R, Cazzaniga W, Saita D, Lucianò R, Ceresola ER, et al. The Microbiome of the Prostate Tumor Microenvironment [Figure presented]. *Eur Urol*. 2017 Oct 1;72(4):625–31.
52. Che B, Zhang W, Xu S, Yin J, He J, Huang T, et al. Prostate Microbiota and Prostate Cancer: A New Trend in Treatment. Vol. 11, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
53. Sadri Nahand J, Esghaei M, Hamidreza Monavari S, Moghoofei M, Jalal Kiani S, Mostafaei S, et al. The assessment of a possible link between HPV-mediated inflammation, apoptosis, and angiogenesis in Prostate cancer. *Int Immunopharmacol*. 2020 Nov 1;88.
54. Sutcliffe S, Viscidi RP, Till C, Goodman PJ, Hoque AM, Hsing AW, et al. Human papillomavirus types 16, 18, and 31 serostatus and prostate cancer risk in the prostate cancer prevention trial. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2010 Feb;19(2):614–8.
55. Bell M, Verberckmoes B, Devolder J, Vermandere H, Degomme O, Guimarães YM, et al. Comparison between the Roche Cobas 4800 Human Papillomavirus (HPV), Abbott RealTime High-Risk HPV, Seegene Anyplex II HPV28, and Novel Seegene Allplex HPV28 Assays for High-Risk HPV Detection and Genotyping in Mocked Self-Samples. *Microbiol Spectr*. 2023 Aug 17;11(4).
56. Arney A, Bennett KM. Molecular diagnostics of human papillomavirus. Vol. 41, *Laboratory Medicine*. 2010. p. 523–30.
57. Williams J, Kostiuk M, Biron VL. Molecular Detection Methods in HPV-Related Cancers. Vol. 12, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
58. Zaravinos A, Mammas IN, Sourvinos G, Spandidos DA. Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). *Int J Biol Markers* [Internet]. 2009 Oct [cited 2024 Jul 9];24(4):215–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
59. Abreu ALP, Souza RP, Gimenes F, Consolaro MEL. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. Vol. 9, *Virology Journal*. BioMed Central Ltd.; 2012.
60. Guenat D, Riethmuller D, Ramanah R, Morel A, Aubin F, Mouglin C, et al. Diagnostic moléculaire des papillomavirus humains (HPV): quel(s) test(s) en pratique clinique ? Vol.

- 45, *Journal de Gynecologie Obstetrique et Biologie de la Reproduction*. Elsevier Masson SAS; 2016. p. 1009–19.
61. *Techniques for Oral Microbiology*. *Atlas of Oral Microbiology*. 2015;15–40.
 62. Villa LL, Denny L. Methods for detection of HPV infection and its clinical utility [Internet]. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2006. Available from: www.elsevier.com/locate/ijgo CHAPTER 7
 63. Siqueira JD, Alves BM, Castelo Branco ABC, Duque KCD, Bustamante-Teixeira MT, Soares EA, et al. Comparison of four different human papillomavirus genotyping methods in cervical samples: Addressing method-specific advantages and limitations. *Heliyon*. 2024 Feb 15;10(3).
 64. Perez S, Cid A, Araujo A, Lamas MJ, Saran MT, Alvarez MJ, et al. A novel real-time genotyping assay for detection of the E6-350G HPV 16 variant. *J Virol Methods* [Internet]. 2011 May [cited 2024 Jul 11];173(2):357–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21419166/>
 65. Mirabello L, Yeager M, Cullen M, Boland JF, Chen Z, Wentzensen N, et al. HPV16 Sublineage Associations With Histology-Specific Cancer Risk Using HPV Whole-Genome Sequences in 3200 Women. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2024 Jul 11];108(9). Available from: [/pmc/articles/PMC5939630/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27111111/)
 66. Mühr LSA, Guerendiain D, Cuschieri K, Sundström K. Human papillomavirus detection by whole-genome next-generation sequencing: Importance of validation and quality assurance procedures. *Viruses*. 2021 Jul 1;13(7).
 67. Gonçalves MFM, Pina-Vaz T, Fernandes ÂR, Miranda IM, Silva CM, Rodrigues AG, et al. Microbiota of Urine, Glans and Prostate Biopsies in Patients with Prostate Cancer Reveals a Dysbiosis in the Genitourinary System. *Cancers (Basel)*. 2023 Mar 1;15(5).
 68. Maxwell ® RSC DNA FFPE Kit [Internet]. Available from: www.promega.com
 69. QIAamp ® DNA Micro Handbook [Internet]. Available from: www.qiagen.com.
 70. T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers [Internet]. Available from: www.nanodrop.com
 71. Sciuto EL, Leonardi AA, Calabrese G, De Luca G, Coniglio MA, Irrera A, et al. Nucleic Acids Analytical Methods for Viral Infection Diagnosis: State-of-the-Art and Future Perspectives. *Biomolecules* 2021, Vol 11, Page 1585 [Internet]. 2021 Oct 27 [cited 2024

- Oct 2];11(11):1585. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-273X/11/11/1585/htm>
72. NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1.0 User Manual [Internet]. 2009. Available from: www.nanodrop.com
 73. NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8 User's Manual [Internet]. 2010. Available from: www.nanodrop.com
 74. Koetsier G, Cantor E, Biolabs E. A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers.
 75. Tsakogiannis D, Gartzonika C, Levidiotou-Stefanou S, Markoulatos P. Molecular approaches for HPV genotyping and HPV-DNA physical status. Vol. 19, Expert Reviews in Molecular Medicine. Cambridge University Press; 2017.
 76. QIAGEN ® Multiplex PCR Handbook Sample & Assay Technologies QIAGEN Sample and Assay Technologies [Internet]. 2010. Available from: www.qiagen.com
 77. TFS-Assets_LSG_manuals_75001b(ExoSAP).
 78. Hennig G, Gehrman M, Stropp U, Brauch H, Fritz P, Eichelbaum M, et al. Automated Extraction of DNA and RNA from a Single Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Section for Analysis of Both Single-Nucleotide Polymorphisms and mRNA Expression. Clin Chem [Internet]. 2010 Dec 1 [cited 2024 Oct 3];56(12):1845–53. Available from: <https://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2010.151233>
 79. Isolamento de ácidos nucleicos de amostras clínicas | Cytiva [Internet]. [cited 2024 Oct 3]. Available from: <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/news-center/nucleic-acid-isolation-from-clinical-samples-10001>
 80. Moreau F, Fetouchi R, Micalessi I, Brejeon V, Bacon N, Jannes G, et al. Detection and genotyping of human papillomavirus by real-time PCR assay. Journal of Clinical Virology. 2013;56(3):328–33.
 81. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 2009 Apr 1;55(4):611–22.
 82. Troubleshoot-your-qPCR-v1.
 83. Francesconi A, Kasai M, Harrington SM, Beveridge MG, Petraitiene R, Petraitis V, et al. Automated and Manual Methods of DNA Extraction for *Aspergillus fumigatus* and

- Rhizopus oryzae Analyzed by Quantitative Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2008 [cited 2024 Oct 4];46(6):1978. Available from: <http://frodo.wi.mit.edu>
84. Venceslau EM, Bezerra MM, Lopes ACM, Souza ÉV, Onofre ASC, De Melo CM, et al. HPV detection using primers MY09/MY11 and GP5+/GP6+ in patients with cytologic and/or colposcopic changes. *J Bras Patol Med Lab*. 2014 Aug 1;50(4):280–5.
 85. Obradovic J, Jurisic V, Tosic N, Mrdjanovic J, Perin B, Pavlovic S, et al. Optimization of PCR Conditions for Amplification of GC-Rich EGFR Promoter Sequence. *J Clin Lab Anal* [Internet]. 2013 Nov [cited 2024 Aug 8];27(6):487. Available from: </pmc/articles/PMC6807403/>
 86. Venceslau EM, Bezerra MM, Lopes ACM, Souza ÉV, Onofre ASC, De Melo CM, et al. HPV detection using primers MY09/MY11 and GP5+/GP6+ in patients with cytologic and/or colposcopic changes. *J Bras Patol Med Lab* [Internet]. 2014 Aug 1 [cited 2024 Oct 4];50(4):280–5. Available from: <https://www.scielo.br/j/jbpm/la/6xvDt47fqjwsjdQDvGM5z6Q/>
 87. De AM, Husman R, Walboomers JMM, Van Den Brule AJC, Meijer CJLM, Snijders PJF. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. Vol. 76, *Journal of General Virology*. 1995.
 88. Hoy MA. DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction: Molecular Biology Made Accessible. *Insect Molecular Genetics*. 2013 Jan 1;307–72.
 89. Lenze D, Müller HH, Hummel M. Considerations for the use of formalin-fixed and paraffin-embedded tissue specimens for clonality analysis. *J Hematop* [Internet]. 2012 Jun 28 [cited 2024 Aug 16];5(1–2):27–34. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12308-012-0138-8>
 90. McNicol PJ, Dodd JG. Detection of papillomavirus DNA in human prostatic tissue by Southern blot analysis. *Can J Microbiol* [Internet]. 1990 [cited 2024 Aug 16];36(5):359–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1697221/>
 91. Sadri Nahand J, Esghaei M, Hamidreza Monavari S, Moghoofei M, Jalal Kiani S, Mostafaei S, et al. The assessment of a possible link between HPV-mediated inflammation, apoptosis, and angiogenesis in Prostate cancer. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2024 Aug 17];88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32889239/>

92. Noda T, Sasagawa T, Dong Y, Fuse H, Namiki M, Inoue M. Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in archival specimens of benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer using a highly sensitive nested PCR method. *Urol Res* [Internet]. 1998 Jun [cited 2024 Aug 17];26(3):165–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9694597/>
93. Glenn WK, Ngan CC, Amos TG, Edwards RJ, Swift J, Lutze-Mann L, et al. High risk human papilloma viruses (HPVs) are present in benign prostate tissues before development of HPV associated prostate cancer. *Infect Agent Cancer* [Internet]. 2017 Dec [cited 2024 Aug 17];12(1). Available from: </pmc/articles/PMC5553674/>
94. Whitaker NJ, Glenn WK, Sahrudin A, Orde MM, Delprado W, Lawson JS. Human papillomavirus and Epstein Barr virus in prostate cancer: Koilocytes indicate potential oncogenic influences of human papillomavirus in prostate cancer. *Prostate* [Internet]. 2013 Feb 15 [cited 2024 Aug 17];73(3):236–41. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pros.22562>
95. Korodi Z, Dillner J, Jellum E, Lumme S, Hallmans G, Thoresen S, et al. Human papillomavirus 16, 18, and 33 infections and risk of prostate cancer: A Nordic nested case-control study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2005 Dec;14(12):2952–5.
96. Lin Y, Mao Q, Zheng X, Yang K, Chen H, Zhou C, et al. Human papillomavirus 16 or 18 infection and prostate cancer risk: a meta-analysis. *Ir J Med Sci* [Internet]. 2011 Jun [cited 2024 Aug 17];180(2):497–503. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21400096/>
97. Ahmed MY, Salman NA, Sandhu S, Cakir MO, Seddon AM, Kuehne C, et al. Detection of high-risk Human Papillomavirus in prostate cancer from a UK based population. *Sci Rep*. 2023 Dec 1;13(1).
98. Yu XD, Yan SS, Liu RJ, Yao-Sheng Zhang . Apparent differences in prostate zones: susceptibility to prostate cancer, benign prostatic hyperplasia and prostatitis. 2024;56:2451–8. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11255-024-04012-w>
99. Cancer Today [Internet]. [cited 2024 Oct 15]. Available from: https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=cancer&group_populations=1&types=0&populations=620&group_cancers=1&multiple_cancers=1

Anexos

Anexo 1–Amostras do grupo A

Amostra	Género	Tipo de Material Biológico
1	*	Citologia em meio líquido
2	*	Citologia em meio líquido
3	*	Citologia em meio líquido
4	*	Citologia em meio líquido
5	*	Citologia em meio líquido
6	*	Citologia em meio líquido
7	Feminino	Citologia em meio líquido
8	*	Citologia em meio líquido
9	Feminino	Citologia em meio líquido
10	Feminino	Citologia em meio líquido
11	Feminino	Citologia em meio líquido
12	Feminino	Citologia em meio líquido
13	Feminino	Citologia em meio líquido
14	Feminino	Citologia em meio líquido
15	Feminino	Citologia em meio líquido
16	Feminino	Citologia em meio líquido
17	Feminino	Citologia em meio líquido
18	Feminino	Citologia em meio líquido
19	*	Citologia em meio líquido
20	*	Citologia em meio líquido
21	*	Citologia em meio líquido
22	*	Citologia em meio líquido
23	*	Citologia em meio líquido
24	Feminino	FFPE
25	Masculino	FFPE
26	Masculino	FFPE
27	Masculino	FFPE
28	Masculino	FFPE
29	Masculino	FFPE
30	Masculino	FFPE
31	Feminino	FFPE
32	Masculino	FFPE

*controles de qualidade

Anexo 2– Protocolo do método de amplificação do HPV do DNA da Mospire®, baseado em PCR em tempo real

Princípio

Este teste baseia-se numa deteção qualitativa de DNA de 24 tipos do vírus do HPV em amostras de citologia ginecológica. O teste identifica especificamente os genótipos de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 26, 53, 66, 73, 82, 6, 11, 42, 43, 44 e 81. Os primers e as sondas fluorescentes *TaqMan* deste kit são desenhados especificamente para os loci E6/E7 do genoma do HPV, e as sondas fluorescentes são marcadas com os corantes fluorescentes FAM, VIC e ROX. Os primers e a sonda do controlo interno deste kit são desenhados a partir de sequências do gene HAPB humano e a sonda é marcada com o corante fluorescente Cy5.

Aplicação Clínica

Genotipagem de HPV em amostras da rotina do Ipatimup Diagnóstico.

Amostra

Amostras de citologia ginecológica e tecido FFPE.

Condições de armazenamento e validade

A validade deste kit é de 24 meses a partir da data de fabrico, quando armazenado ente 2–8°C. Sugere-se transportar o kit abaixo de 42°C. Nunca deixar o kit por mais de 30 dias a 42°C. O kit deve armazenar-se na ausência de luz. Ao abrir as embalagens seladas os reagentes devem ser utilizados na totalidade. Não podendo utilizar todos de uma vez, os restantes devem ser guardados a $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ no máximo 15 dias.

Reagentes fornecidos

Com cada kit é possível fazer 24 testes, e os reagentes fornecidos pelo mesmo são os seguintes:

Tabela 1- Reagentes fornecidos pelo kit *Mospire*

Rótulo	Conteúdo	Quantidade
<i>Strips</i> reagentes PCR (HPV 24)	Poço 1- mistura de dNTPs, magnésio, primers e sondas HPV 16, 18, 31 e HAPB, UDG e Taq DNA polimerase, etc.	24 <i>strips</i>
	Poço 2- mistura de dNTPs, magnésio, primers e sondas HPV 33, 35, 39 e HAPB, UDG e Taq DNA polimerase, etc.	
	Poço 3- mistura de dNTPs, magnésio, primers e sondas HPV 45, 51, 52 e HAPB, UDG e Taq DNA polimerase, etc.	
	Poço 4- mistura de dNTPs, magnésio, primers e sondas HPV 56, 58, 59 e HAPB, UDG e Taq DNA polimerase, etc.	
	Poço 5- mistura de dNTPs, magnésio, primers e sondas HPV 68, 26, 53 e HAPB, UDG e Taq DNA polimerase, etc.	
	Poço 6- mistura de dNTPs, magnésio, primers e sondas HPV 66, 73, 82 e HAPB, UDG e Taq DNA polimerase, etc.	
	Poço 7- mistura de dNTPs, magnésio, primers e sondas HPV 6, 11, 42 e HAPB, UDG e Taq DNA polimerase, etc.	
	Poço 8 - mistura de dNTPs, magnésio, primers e sondas HPV 43, 44, 81 e HAPB, UDG e Taq DNA polimerase, etc.	
Controlo Positivo (HPV 24)	Fragmentos do gene E6/E7 detetados nos 24 tipos de HPV e do gene HAPB	1 tubo (700 μ L/tubo)*
Controlo Negativo (HPV 24)	Fragmentos do gene HAPB	1 tubo (700 μ L/tubo)*
Água sem nucleases	Água sem nucleases	2 tubos (0.7 MI/tubo)
8 tampas de <i>strips</i>	-----	24 porções

*Pós-extração, cada tubo dá para 7 ensaios

Para a utilização deste kit é necessário outro material, não fornecido pelo mesmo, tal como:

- Kit de extração de ácidos nucleicos
- Consumíveis: Pontas de filtro, tubos de 1.5 mL
- Equipamento experimental: Centrifuga para tubos de 1.5 mL, *strips* poços PCR ou placas de 96 poços, vortex, instrumento PCR em tempo real (termociclador).
- Outros: Micropipetas (0.5–20 μ L, 10–100 μ L, 20–200 μ L, 100–1000 μ L), luvas

Procedimento:

1. Extração de DNA pelo método automático
 - Preparar as amostras e os controlos positivo e negativo incluídos neste kit com o kit de extração, Maxwell® DNA FFPE Kit, de acordo com o protocolo do fabricante;
2. Preparação dos reagentes de amplificação (Sala de pré-PCR)
 - Retirar os reagentes do kit e da embalagem;

- Centrifugar a 3000–6000 rpm durante 10 segundos para que o pellet se concentre no fundo do poço;
- Alinhar as strips numa direção consistente (começando no poço 1 e progredindo até ao poço 8) num suporte numa posição correspondente à da placa de 96 poços (Nota: Ao retirar uma strip use sempre luvas PE ou luvas de látex sem pó para evitar a contaminação do exterior do tubo, o que pode afetar o teste);
- Remover as tampas com cuidado e adicionar 15 µL de água sem nucleases em cada poço.
- Adicionar 5 µL de DNA de cada amostra e de controlos positivo e negativo (preparados na primeira etapa: pré – PCR) em cada poço contendo os reagentes de PCR e fechar com tampas de strips;
- Homogeneizar bem utilizando o vortex;
- Centrifugar a 2000–3000 rpm durante 20 segundos;
- Transferir as amostras para uma placa de 96 poços adequada ao equipamento *7500 Fast da Applied Biosystems* ou ao termociclador *CFX96 da Bio-Rad*;

Exemplo (tabela 2): Extrair 10 amostras, bem como os controlos positivo e negativo e marcar os tubos de A1–A10, PC e NC, respetivamente. Utilizar 12 strips de reagentes de PCR (HPV 24), alinhá-las numa direção consistente (começando no poço 1 e progredindo até ao poço 8) e adicionar 15 µL de água sem nucleases em cada poço e, em seguida, adicionar 5 µL de amostra na respetiva coluna, bem como os controlos positivo e negativo. Por exemplo, adicionar A1 a cada poço de A1–H1, adicionar A2 a cada poço de A2–H2, etc. Centrifugar depois de fechar as strips.

Tabela 2- Exemplo de uma placa de 96 poços com 10 amostras e controlos positivo e negativo

Reagentes na <i>strip</i>	Localização	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Poço 1	A	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	PC	NC
Poço 2	B	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	PC	NC
Poço 3	C	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	PC	NC
Poço 4	D	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	PC	NC
Poço 5	E	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	PC	NC
Poço 6	F	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	PC	NC
Poço 7	G	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	PC	NC
Poço 8	H	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	PC	NC

3. Amplificação (Sala pós-PCR)

Para o Termociclador 7500 Fast da Applied Biosystems:

- Colocar a placa de 96 poços no termociclador 7500 Fast da Applied Biosystems e configurar o mesmo no modo presença/ ausência "presence/absence" segundo o protocolo Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System Getting Started Guide for Presence/Absence Experiments disponibilizado no site da Thermo Fisher;
- Selecionar o equipamento utilizado (7500 Fast);
- Selecionar a experiência presença/ausência "presence/absence";
- Selecionar as sondas TaqMan;
- Selecionar a corrida Standard;
- No separador "Define Targets and Samples", na coluna "Target Name", adicionar o nome dos vários genótipos de HPV e associar os respetivos fluorocromos ("Reporter") (Figura 1) de acordo com a tabela 3;
- Selecionar a coluna "Quencher" como "none";

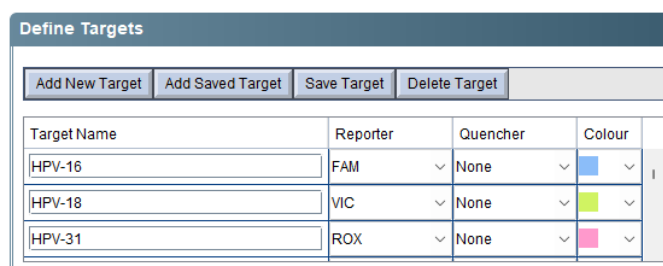


Figura 1– Separador Define Targets

Tabela 3– Genótipos associados aos diferentes fluorocromos nas diferentes mixes

Mix	Fluorocromo	Genótipo	Mix	Fluorocromo	Genótipo
Mix 1	FAM	HPV-16	Mix 5	FAM	HPV-68
	VIC	HPV-18		VIC	HPV-26
	ROX	HPV-31		ROX	HPV-53
Mix 2	FAM	HPV-33	Mix 6	FAM	HPV-66
	VIC	HPV-35		VIC	HPV-73
	ROX	HPV-39		ROX	HPV-82
Mix 3	FAM	HPV-45	Mix 7	FAM	HPV-6
	VIC	HPV-51		VIC	HPV-11
	ROX	HPV-52		ROX	HPV-42
Mix 4	FAM	HPV-56	Mix 8	FAM	HPV-43
	VIC	HPV-58		VIC	HPV-44
	ROX	HPV-59		ROX	HPV-81

Nota: Em todos os poços adicionar o fluorocromo Cy5

- No mesmo separador adicionar o nome das amostras;
- No separador “Assign Targets and Samples”, em cada poço, adicionar o nome da amostra e seleccionar os fluorocromos com os génotipos correspondentes (4 fluorocromos por poço);
- Nos poços das amostras e do controlo positivo, para os fluorocromos FAM, VIC, ROX adicionar a Task “U-Unknown” e para o Cy5 adicionar a Task “I-IPC”(Figura 2);
- Nos poços do controlo negativo, para os fluorocromos FAM, VIC, ROX adicionar a Task “N- Negative Control” e para o Cy5 adicionar a Task “I- IPC” (Figura3);

Assign	Target	Task
<input checked="" type="checkbox"/>	FAM	
<input checked="" type="checkbox"/>	VIC	
<input checked="" type="checkbox"/>	ROX	
<input checked="" type="checkbox"/>	Controlo interno	

Mixed Unknown IPC Negative Control Blocked IPC

Figura 2- Task a adicionar nas amostras e no controlo positivo

Assign	Target	Task
<input checked="" type="checkbox"/>	FAM	
<input checked="" type="checkbox"/>	VIC	
<input checked="" type="checkbox"/>	ROX	
<input checked="" type="checkbox"/>	Controlo interno	

Mixed Unknown IPC Negative Control Blocked IPC

Figura 3- Task a adicionar no controlo negativo

- Seleccionar a opção “Passive reference” como “none”;
- Definir o volume de reacção por poço para 20 µL;
- Definir o programa de ciclos da seguinte forma (tabela 4):

Tabela 4- Programa de ciclos para o kit da Mospire

Passo	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (min:sec)
1	1	50	05:00
2	1	95	05:00
3	5	94	00:10
		58	00:30
4	45	94	00:10
		56*	00:30

*Os dados de sinal são recolhidos a 56 °C.

Para o termociclador CFX96 da Bio-Rad:

- Colocar a placa no termociclador e configurar o mesmo segundo o protocolo "*C100 Touch™ Thermal Cycler and CFX Real-Time PCR Detection Systems- Instrument Guide*";
- Definir o programa de ciclos representado na tabela 4;
- Na execução do *template* adicionar os fluorocromos FAM, VIC, ROX e Cy5;
- Na opção "*Experiment Settings*" no separador "Targets", adicionar o nome dos genótipos e no separador "*Samples and Biological Groups*" adicionar o nome das amostras;
- Na opção "*Target names*" associar cada genótipo ao respetivo fluorocromo de acordo com a tabela 3;
- Em cada poço, adicionar o nome da amostra e os fluorocromos com os genótipos correspondentes (4 fluorocromos por poço);

Valor *cut-off*

O valor de *cut-off* do FAM, VIC e ROX é 34,00. O valor de *cut-off* do controlo interno é determinado como sendo 30.

Explicação dos resultados do teste

No final da reação, o *software* associado ao equipamento (7500 Fast/CFX96) guarda automaticamente os resultados, ajusta os valores inicial, final e *threshold* da *baseline* após a análise da imagem (é autoajustável pelo utilizador: os valores iniciais podem estar entre 3 e 15; os valores finais podem estar entre 5 e 20).

- Equipamento 7500 Fast da Applied Biosystems

Quando é utilizado este equipamento, os resultados devem ser transferidos do *software* 7500 v2.3 para a Cloud (aplicação *Design and Analysis New qPCR*) disponibilizada no site da Thermo Fisher para serem analisados (Link Cloud: <https://apps.thermofisher.com/apps/spa/#/dashboard>);

Nota: Por cada corrida adicionada à Cloud, clicar em "*Actions*", de seguida em *Primary Analysis Setting* e selecionar o *Threshold* como automático (Figura 6);

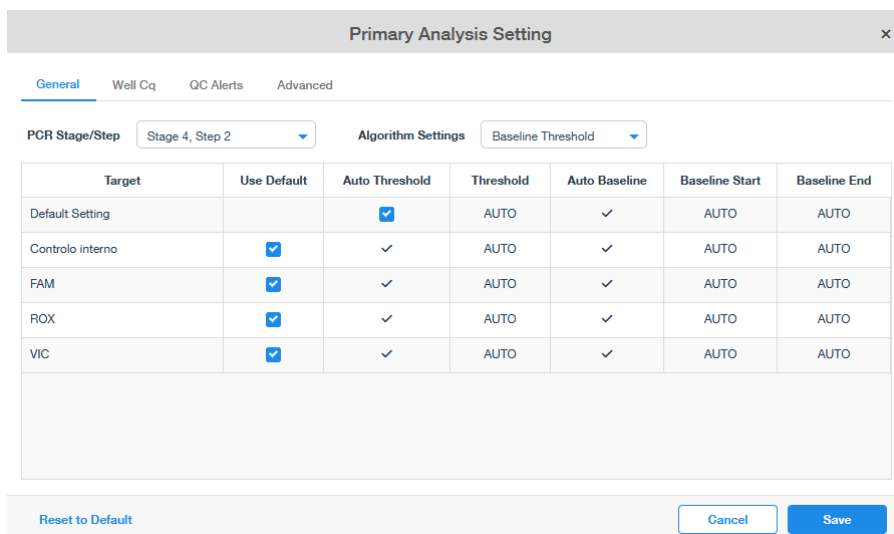


Figura 6 - Threshold automático na Cloud da Thermo Fisher

No separador *Quality Check* observamos os gráficos com as curvas de amplificação correspondentes a cada fluorocromo (podemos colocar em 2 modos: *Amplification Plot* e *Multicomponent Plot*) e uma tabela com várias informações sobre as amostras, nomeadamente os valores de Ct (Figura 7).

No separador *Presence Absence* observamos o gráfico no modo *Amplification Plot* novamente uma tabela com muitas informações sobre as amostras, desta vez temos a informação da coluna "Call", que nos informa se certo genótipo de HPV está presente ou ausente em cada amostra (Figura 8).



Figura 7- Separador Quality Check da Cloud da Thermo Fisher

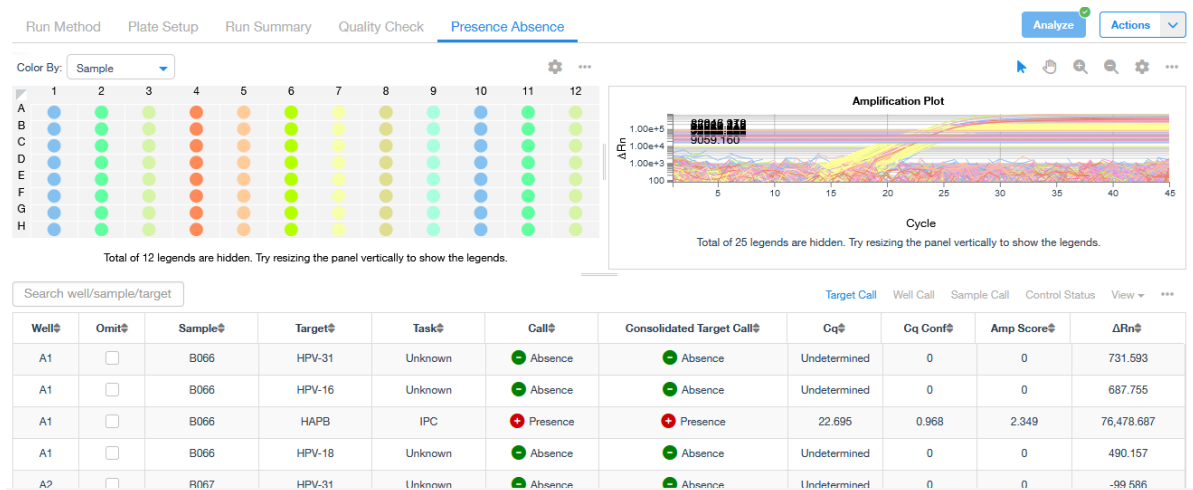


Figura 8– Separador Presence Absence da Cloud da Thermo Fisher

Para gerar um documento com os resultados, deve escolher a opção "Actions" e de seguida o separador "Generate Report". O documento é automaticamente guardado nos ficheiros da Cloud e posteriormente pode ser transferido. Neste documento devem estar incluídas 2 informações:

- "Plate Setup", que apresenta esquema da placa, com os valores de Ct para cada genótipo (Figura 9);
- Tabela "Presence Absence"(Figura 10);



Figura 9–Esquema da placa presente no "Report"

Presence/Absence Target Calls

Well	Sample	Target	Task	Call	Cq	ΔRn
A1	B066	HPV-31	Unknown	Absence	Undetermined	731.593
A1	B066	HPV-16	Unknown	Absence	Undetermined	687.755
A1	B066	HAPB	IPC	Presence	22.695	76,478.687
A1	B066	HPV-18	Unknown	Absence	Undetermined	490.157
A2	B067	HPV-31	Unknown	Absence	Undetermined	-99.586
A2	B067	HPV-16	Unknown	Absence	Undetermined	-76.499
A2	B067	HAPB	IPC	Presence	19.592	71,870.799
A2	B067	HPV-18	Unknown	Absence	Undetermined	202.887
A3	B068	HPV-31	Unknown	Absence	Undetermined	-127.951
A3	B068	HPV-16	Unknown	Absence	Undetermined	914.556
A3	B068	HAPB	IPC	Presence	19.252	91,218.552
A3	B068	HPV-18	Unknown	Absence	Undetermined	610.53
A4	B069	HPV-31	Unknown	Absence	Undetermined	4.82
A4	B069	HPV-16	Unknown	Absence	Undetermined	618.218
A4	B069	HAPB	IPC	Presence	21.911	101,891.056
A4	B069	HPV-18	Unknown	Absence	Undetermined	727.91

Figura 10- Tabela "Presence Absence" presente no "Report"

- Equipamento CFX96 da Bio-Rad

Quando é utilizado este equipamento os resultados são analisados no *software CFX Maestro v2.2* (Figura11). Depois de transferir os resultados para o *software*, devemos seleccionar a opção "*Plate Setup*" e de seguida o separador "*Replace Plate File*" para associar o *template* aos resultados.

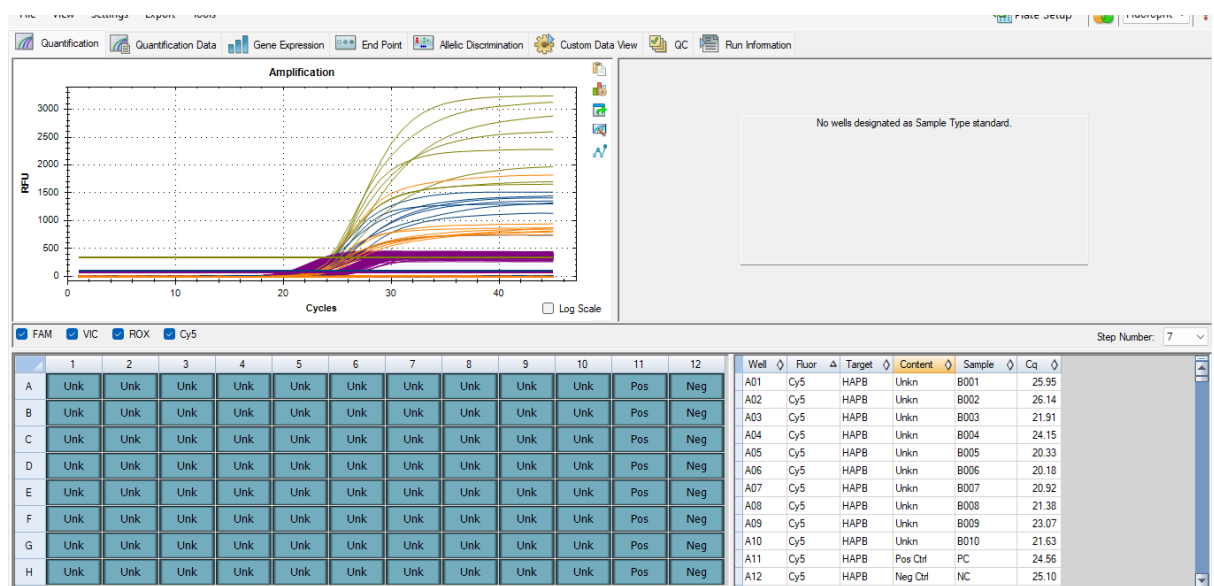


Figura 11- Análise dos resultados no software CFX Maestro v2.2

Para gerar um documento com os resultados deve ser escolhido o separador “Tools” e de seguida opção “Reports”. Neste documento está presente uma tabela com os valores de Ct de cada fluorocromo para cada amostra (Figura12).

Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
A01	Cy5	HAPB	Unkn	B001	25.95	25.95	0.000
A02	Cy5	HAPB	Unkn	B002	26.14	26.14	0.000
A03	Cy5	HAPB	Unkn	B003	21.91	21.91	0.000
A04	Cy5	HAPB	Unkn	B004	24.15	24.15	0.000
A05	Cy5	HAPB	Unkn	B005	20.33	20.33	0.000
A06	Cy5	HAPB	Unkn	B006	20.18	20.18	0.000
A07	Cy5	HAPB	Unkn	B007	20.92	20.92	0.000
A08	Cy5	HAPB	Unkn	B008	21.38	21.38	0.000
A09	Cy5	HAPB	Unkn	B009	23.07	23.07	0.000
A10	Cy5	HAPB	Unkn	B010	21.63	21.63	0.000
A11	Cy5	HAPB	Pos Ctrl	PC	24.56	24.56	0.000
A12	Cy5	HAPB	Neg Ctrl	NC	25.10	25.10	0.000
B01	Cy5	HAPB	Unkn	B001	25.21	25.21	0.000
B02	Cy5	HAPB	Unkn	B002	26.68	26.68	0.000
B03	Cy5	HAPB	Unkn	B003	21.62	21.62	0.000
B04	Cy5	HAPB	Unkn	B004	23.09	23.09	0.000
B05	Cy5	HAPB	Unkn	B005	20.36	20.36	0.000
B06	Cy5	HAPB	Unkn	B006	20.10	20.10	0.000

Figura 12- Tabela presente no “Report”

Anexo 3- Resultados das amostras do grupo A avaliados na *Cloud (Thermo Fisher)* e no software *CFX Maestro (v 2.2)*

Amostra	Software de análise utilizado	Resultado Esperado Kit CLART®	Resultado Obtido Kit Mospire®	Ct FAM/VIC/ROX (≤ 34)	Ct Cy5 (≤30)	Concordância
1	Cloud (Thermo Fisher)	HPV-18	HPV-18	14 (VIC)	13	Concordante
2	Cloud (Thermo Fisher)	HPV-18	HPV-18	19 (VIC)	19	Concordante
3	Cloud (Thermo Fisher)	HPV-16	HPV-16	23 (FAM)	24	Concordante
4	Cloud (Thermo Fisher)	HPV-18	HPV-18	17 (VIC)	15	Concordante
5	Cloud (Thermo Fisher) CFX Maestro (v 2.2)	HPV-16	HPV-16	21 (FAM)	20	Concordante
6	Cloud (Thermo Fisher) CFX Maestro (v 2.2)	HPV-18	HPV-18	17 (VIC)	16	Concordante
7	Cloud (Thermo Fisher)	HPV-39 HPV-56 HPV-58 (HPV-61) *	HPV-39 HPV-56 HPV-58 HPV-33	9(ROX) 18(FAM) 13(VIC) 21(FAM)	21	Discordante
8	Cloud (Thermo Fisher)	HPV-16	HPV-16	23 (FAM)	23	Concordante
9	Cloud (Thermo Fisher)	HPV-53 (HPV-89) *	HPV-53	24 (ROX)	20	Concordante
10	Cloud (Thermo Fisher)	HPV-18	HPV-18	14 (VIC)	13	Concordante
11	Cloud (Thermo Fisher)	HPV42 HPV-51 (HPV-61) * (HPV-89) *	HPV-42 HPV-51	16(ROX) 17(VIC)	12	Concordante
12	Cloud (Thermo Fisher)	HPV-68 (HPV-40) *	HPV-68	26 (FAM)	12	Concordante
13	Cloud (Thermo Fisher)	HPV-44 HPV-68	HPV-44 HPV-68	12 (VIC)	14	Concordante
14	Cloud (Thermo Fisher)	NEGATIVO (HPV-72) *	NEGATIVO	Não determinado	14	Concordante
15	Cloud (Thermo Fisher)	HPV-59	NEGATIVO	Não determinado	17	Discordante

Amostra	Software de análise utilizado	Resultado Esperado Kit CLART®	Resultado Obtido Kit Mospire®	Ct FAM/VIC/ROX (≤ 34)	Ct Cy5 (≤30)	Concordância
16	CFX Maestro (v 2.2)	HPV-18 HPV-52	HPV-18 HPV-52	27 (VIC) 18 (ROX)	17	Concordante
17	CFX Maestro (v 2.2)	HPV-16 (HPV-54) * (HPV-61) * HPV-66	HPV-16 HPV-66	25 (FAM) 13 (FAM)	15	Concordante
18	CFX Maestro (v 2.2)	HPV-68	HPV-68 HPV-11	20 (FAM) 32 (VIC)	14	Discordante
19	CFX Maestro (v 2.2)	HPV-18	HPV-18	18 (VIC)	20	Concordante
20	CFX Maestro (v 2.2)	HPV-16	HPV-16	22 (FAM)	23	Concordante
21	CFX Maestro (v 2.2)	HPV-18	HPV-18	19 (VIC)	18	Concordante
22	CFX Maestro (v 2.2)	NEGATIVO	NEGATIVO	Não determinado	22	Concordante
23	CFX Maestro (v 2.2)	HPV-16	HPV-16	21 (FAM)	21	Concordante
24	Cloud (Thermo Fisher)	HPV-42 HPV-53	HPV-42 HPV-53	17 (ROX) 24 (ROX)	16	Concordante
25	Cloud (Thermo Fisher)	HPV-33	HPV-33	16 (FAM)	18	Concordante
26	Cloud (Thermo Fisher)	HPV-6	HPV-6	16 (FAM)	19	Concordante
27	Cloud (Thermo Fisher)	HPV-44	HPV-44	9(VIC)	15	Concordante
28	Cloud (Thermo Fisher)	HPV-6 HPV-73	HPV-6 HPV-73	19(FAM) 26(VIC)	23	Concordante
29	Cloud (Thermo Fisher)	NEGATIVO (HPV-84) *	NEGATIVO	Não determinado	21	Concordante
30	Cloud (Thermo Fisher)	HPV-51	HPV-51	24 (VIC)	16	Concordante
31	CFX Maestro (v 2.2)	HPV-11	NEGATIVO	Não determinado	22	Discordante
32	CFX Maestro (v 2.2)	HPV-11 HPV-82	HPV-11 HPV-82	13 (VIC) 27 (ROX)	18	Concordante
Controlo positivo	Cloud (Thermo Fisher)	NA	Positivo para todas as estirpes de HPV incluindo controlo interno	Não determinado	22	Concordante
Controlo negativo	Cloud (Thermo Fisher)	NA	Apenas positivo para o controlo interno	Não determinado	23	Concordante

*Estirpe não detetada pelo teste de amplificação da Mospire®