

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

LAYS PAULA BONDI VOLPINI

**POTENCIAIS BIOMARCADORES DE LESÃO DE COLO UTERINO E
ANAL POR GENÓTIPOS DE HPV DE ALTO RISCO EM
SOROPOSITIVOS E SORONEGATIVOS PARA HIV**

**VITÓRIA
2021**

LAYS PAULA BONDI VOLPINI

**POTENCIAIS BIOMARCADORES DE LESÃO DE COLO UTERINO E
ANAL POR GENÓTIPOS DE HPV DE ALTO RISCO EM
SOROPOSITIVOS E SORONEGATIVOS PARA HIV**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Dr^a. Liliana Cruz Spano.

Coorientadora: Dr^a. Angélica Espinosa Miranda.

VITÓRIA
2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

V933p Volpini, Lays Paula Bondi, 1990-
Potenciais biomarcadores de lesão de colo uterino e anal por genótipos de HPV de alto risco em soropositivos e soronegativos para HIV / Lays Paula Bondi Volpini. - 2021.
148 f. : il.

Orientadora: Liliana Cruz Spano.
Coorientadora: Angelica Espinosa Miranda.
Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Papilomavírus. 2. Biologia molecular. 3. Populações vulneráveis. I. Spano, Liliana Cruz. II. Miranda, Angelica Espinosa. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE TESE DE DOUTORADO

A doutoranda **Lays Paula Bondi Volpini** apresentou a tese intitulada “POTENCIAIS BIOMARCADORES DE LESÃO DE COLO UTERINO E ANAL POR GENÓTIPOS DE HPV DE ALTO RISCO EM SOROPOSITIVOS E SORONEGATIVOS PARA HIV” em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Doenças Infecciosas do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, sua qualidade e relevância, a Comissão Examinadora decidiu (X) aprovar () reprovar a tese habilitando **Lays Paula Bondi Volpini** a obter o Grau de Doutora em Doenças Infecciosas.

Vitória, 18 de março de 2021

Prof. Dr. **Enrique Mario Boccardo Pierulivo**
(Membro Externo)

Profa. Dra. **Sandra Lúcia Ventorin von Zeidler**
(Membro Externo)

Profa. Dra. **Kênia Valéria dos Santos**
(Membro Interno)

Profa. Dra. **Ana Paula Ferreira Nunes**
(Membro Interno)

Profa. Dra. **Liliana Cruz Spano**
(Orientadora)

Profa. Dra. **Angélica Espinosa Barbosa Miranda**
(Coorientadora)

Lays Paula Bondi Volpini
Discente



Campus Universitário Alaor de Queiroz Araújo – Av. Fernando Ferrari, 514 – Goiabeiras, Vitória – ES | 29075-910 |
Tel. e Fax: (27) 4009-2924 | www.quimica.vitoria.ufes.br | ppgq.ufes@gmail.com

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua bondade, fidelidade e misericórdia. Por me fortalecer e encorajar a prosseguir;

Às minhas orientadoras, Liliana Cruz Spano e Angélica Espinosa Miranda, pela oportunidade, aprendizado, paciência e confiança;

À banca examinadora por aceitarem o convite e pela contribuição;

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pela concessão da bolsa de doutorado;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas por contribuírem para minha formação;

Aos meus pais, por acreditarem que este momento seria possível. Também à minha irmã pela amizade e apoio;

Aos meus amigos e familiares, pela compreensão nos momentos de ausência, pelo apoio e orações;

À Luciana Bueno de Freitas pela amizade e auxílio na metodologia deste trabalho;

Aos amigos do LabViG pela companhia e momentos agradáveis;

Aos amigos do Lacen pelo incentivo e companheirismo;

Ao meu marido, Helio, pelo amor, paciência, companheirismo e incentivo.

PREÂMBULO

Este documento de tese está apresentado no formato de manuscritos, contendo, além da introdução, revisão de literatura e discussão, os seguintes itens na seção de resultados:

(i) um manuscrito publicado na *BMC Infectious diseases* com a descrição da prevalência da infecção por HPV e a carga viral dos genótipos de HR-HPV correspondentes aos da vacina nonavalente em mulheres residentes em comunidades quilombolas;

(ii) um manuscrito a ser submetido para publicação com a descrição dos genótipos de HPV e variantes do HPV16 em mulheres brasileiras HIV-positivas, um estudo multicêntrico;

(ii) um manuscrito a ser submetido para publicação avaliando a carga viral e a quantificação de mRNA E7, dos HR-HPV correspondentes aos da vacina nonavalente, como potenciais biomarcadores para lesões cervicais e anais em indivíduos HIV-positivos e negativos.

RESUMO

A infecção por genótipos de alto risco do papilomavírus humano (HR-HPV) é o principal fator de risco para o desenvolvimento de câncer do colo do útero (CCU) e anal (CA). Algumas populações são mais vulneráveis ao desenvolvimento desses cânceres, seja devido à imunossupressão, como no caso de indivíduos HIV-positivos, ou devido ao acesso limitado aos serviços de saúde, como é o caso de mulheres quilombolas. A utilização de biomarcadores, como a carga viral e expressão de oncogenes virais, seria útil para orientar futuros algoritmos de rastreamento nessas populações. O objetivo do estudo foi determinar os genótipos de HPV em população de mulheres vulneráveis (HIV-positivas e quilombolas) e investigar se carga viral e quantificação de transcritos do oncogene *E7* (mRNA *E7*) dos HR-HPV correspondentes aos da vacina nonavalente (9vHPV) estão relacionadas com lesões cervicais e anais de indivíduos HIV-positivos e negativos. DNA viral foi pesquisado por PCR, o genótipo determinado por *Reverse Line Blot* (RLB) e *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) e as variantes de HPV16 foram determinadas por sequenciamento gênico. Carga viral e mRNA *E7* foram pesquisados por PCR em tempo real. Nas mulheres quilombolas, a frequência do HPV foi de 11,4% e associada a alterações citológicas ($p < 0,001$). Infecção por HR-HPV ocorreu em 64,5% e os tipos mais frequentes foram HPV52 > 58, 59. A carga viral foi maior nas lesões do que nos casos de citologia normal ($p = 0,04$). Nas mulheres HIV-positivas, os HPV16, 52 e 31 foram os mais frequentes e a variante Europeia do HPV16 foi a mais prevalente. Houve um aumento da carga viral de citologia normal para lesão tanto em indivíduos HIV-positivos como negativos ($p = 0,01$). Este aumento foi significativo nas amostras cervicais positivas para HPV16 de mulheres HIV-negativas ($p < 0,001$) e nas cervicais e anais positivas para HPV31 ($p = 0,04$ e $p = 0,02$, respectivamente) nos indivíduos HIV-positivos. Na análise de mRNA *E7*, houve um aumento da mediana do número de cópias de normal para lesão ($p = 0,02$) e correlação moderada e positiva entre aumento da carga viral e mRNA ($r = 0,61$; $p < 0,001$). Este estudo demonstrou que os genótipos mais frequentes nas populações vulneráveis são aqueles contemplados na 9vHPV e maior carga viral e mRNA esteve presente nos casos de lesão cervical e anal, indicando o benefício dessa vacina e desses biomarcadores para o rastreamento de lesões precursoras do câncer nessas populações.

Palavras-chave: HPV. HIV. Quilombolas. Carga viral. mRNA.

ABSTRACT

Infection with high-risk genotypes of human papillomavirus (HR-HPV) is the main risk factor for the development of cervical (CC) and anal (CA) cancer. Some populations are more vulnerable to the development of these cancers, either due to immunosuppression, as in HIV-positive individuals, or due to limited access to health services, as is the case of quilombola women. The use of biomarkers, such as viral load and expression of viral oncogenes, would be useful to guide future screening algorithms in these populations. This study aimed to determine the HPV genotypes in populations of vulnerable women (HIV-positive and quilombola) and to investigate whether viral load and quantification of HR-HPV E7 oncogene (E7 mRNA) transcripts are related to cervical and anal lesions of HIV-positive and negative individuals. Viral DNA was screened by PCR, the genotype determined by Reverse Line Blot (RLB) and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), and the HPV16 variants were determined by genetic sequencing. Viral load and E7 mRNA were obtained by real-time PCR. In quilombola women, the frequency of HPV was 11.4% and associated with cytological abnormalities ($p < 0.001$). HR-HPV infection occurred in 64.5% and, the most frequent types were HPV52, 58, 59. Viral load was higher in lesions than in normal cytology cases ($p = 0.04$). In HIV-positive women, HPV16, 52, and 31 were the most frequent and, the European HPV16 variant was the most prevalent. There was an increase of viral load median from normal cytology to lesion in HIV-positive and negative individuals ($p = 0.01$). This increase was significant in HPV16-positive cervical samples from HIV-negative women ($p < 0.001$) and in HPV31-positive cervical and anal samples ($p = 0.04$ and $p = 0.02$, respectively) in HIV-positive individuals. In the analysis of mRNA E7, there was an increase in the median from normal to injury ($p = 0.02$) and a moderate and positive correlation between increased viral load and detection of mRNA ($r = 0.61$; $p < 0.001$). This study demonstrated that the most frequent genotypes in vulnerable populations are those included in the nonavalent vaccine and the highest viral load and mRNA present in cases of cervical and anal lesions, indicating the benefit of this vaccine and these biomarkers for screening for cancer precursor lesions in these populations.

Keywords: HPV. HIV. Quilombolas. Viral load. mRNA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Árvore filogenética dos HPVs.....	22
Figura 2 – Fotomicrografia eletrônica do HPV.....	23
Figura 3 - Genoma do HPV, apresentado as regiões não codificadora (LCR), precoce (E) e tardia (L).	23
Figura 4 - Expressão gênica do HPV, síntese de proteínas precoces (E) e tardias (L) e amplificação do genoma viral.	24
Figura 5 - Progressão de uma lesão benigna do colo do útero para câncer cervical invasivo.	28
Figura 6 - Genoma do HPV apresentado de forma linear.	35
Figura 7 – Mecanismo de ação dos intercalantes de DNA e sondas de hidrólise.	36
Figura 8 - Esboço e exemplo de hibridização reversa.....	37
Figura 9. Fluxograma referente à seleção das amostras para o estudo.	44
Figura 10 – Comunidades quilombolas de Linharinho (Conceição da Barra) e São Domingos (Conceição da Barra/São Mateus).	46
Figura 11 - Mapa dos municípios de São Mateus e Conceição da Barra e as respectivas Comunidades Quilombolas.	47
Figura 12 – Fluxograma referente aos procedimentos de coleta e processamento de espécimes cervicais de mulheres residentes em comunidades quilombolas.	48
Figura 13 - Fluxograma referente ao processamento dos espécimes cervicais de mulheres HIV+.	50
Figura 14 - Representação esquemática das etapas de extração do DNA com o kit QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN).....	51
Figura 15 - Gráfico da amplificação da curva-padrão do gene β -globina por qPCR.	61
Figura 16 – Gráficos da amplificação da curva-padrão do HPV18 por qPCR.	62
Figura 17 - Gráfico da amplificação das curvas-padrão do HPV18 e do gene β -globina por qPCR.....	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Genótipos de HPV e apresentações clínicas.	27
Quadro 2 - Comparação entre as vacinas atualmente disponíveis.	33
Quadro 3 – Descrição dos projetos utilizados para obtenção das amostras do estudo.	45
Quadro 4 - Número de amostras coletadas e positivas para HR-HPV por meio do COBAS® HPV test de mulheres HIV+ atendidas em CR-DST/AIDS, no período de março a dezembro de 2015.....	49
Quadro 5 - Primers consensuais PGMY09/11 utilizados na detecção por PCR e posterior tipagem de HPV por RLB.	52
Quadro 6 - Mistura para PCR para o gene <i>β-globina</i> e HPV.....	53
Quadro 7 - Programas de amplificação utilizados para gene <i>β-globina</i> e HPV.....	53
Quadro 8 - Sondas para Hibridização Reversa em Linhas.	55
Quadro 9 - <i>Primers</i> para a região <i>LCR</i> do HPV16	57
Quadro 10 - Sequências usadas como referência para alinhamento e análise filogenética de HPV16.....	57
Quadro 11 - Primers e sondas utilizados na reação de qPCR.	59
Quadro 12 - Concentração dos reagentes utilizados para amplificação dos HPV16 e 18.	60
Quadro 13 - Programas de amplificação de HPV e <i>β-globina</i>	60

LISTA DE SIGLAS

AIDS - *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (Síndrome da imunodeficiência adquirida)

a.C – antes de Cristo

ASCUS - *Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance* (Atipia de célula escamosa com significado indeterminado)

ASC-H - *Atypical squamous cells cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion* (Células escamosas atípicas em que não se pode excluir lesão de alto grau)

BPV-1 - *Bovine papillomavirus* (papilomavírus bovino)

CA – Câncer anal

CCS – Centro de Ciências da Saúde

CCU - Câncer do colo do útero

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CFS - *Common fragile sites* (sítios frágeis comuns)

CR - Centro de Referência

Ct - *Cycle Threshold*

DNA - *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxi-ribonucléico)

cDNA – *Complementary DNA* (DNA complementar)

DNA_{df} - DNA dupla fita

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Tifosfatados

DST - Doenças Sexualmente Transmissíveis

E - *Early* (precoce)

EGFR – *Epidermal growth factor receptor* (Receptor do fator de crescimento epidérmico)

Et al. - et alii, do latim: e colegas

EtBr - Brometo de Etídeo

EV- Epidermodisplasia verruciforme

FDA - *Food and Drug Administration*

GSK - GlaxoSmithKline

g - Força gravitacional da centrífuga

HIV - *Human Immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)

HPV - *Human papillomavirus* (papilomavírus humano)

HR-HPV – *High-risk HPV* (HPV de alto risco)

HSIL - *High grade squamous intraepithelial lesion* (lesão intraepitelial de alto grau)

HSH – Homens que fazem sexo com homens

HUCAM - Hospital Universitário Cassiano Antonio Moraes

IR-HPV - *Indeterminate Risk HPV* (HPV de risco indeterminado)

IST – Infecção sexualmente transmissível

JEC - Junção escamoso colunar

kb - Kilobases

L - *Late* (tardio)

LabViG – Laboratório de Virologia e Gastroenterite Infecciosa

LCR - *Long control region* (região longa de controle)

LR-HPV – *Low-risk HPV* (HPV de baixo risco)

LSIL - *Low grade squamous intraepithelial lesion* (lesão intraepitelial de baixo grau)

M - Molar

min. - Minutos

mL - Mililitro

mM – Milimolar

MSD - Merck Sharp & Dohme

NIA - Neoplasia intraepitelial anal

NIC - Neoplasia intraepitelial cervical

ng - Nanogramas

nm - Nanômetros

OMS - Organização Mundial de Saúde

ORF - *Open Reading Frame* (fase de leitura aberta)

PA - Puro para análise

pb - Pares de bases

PCR - *Polymerase chain reaction* (reação em cadeia pela polimerase)

pg – Picograma

pmol - Picomol

PNI - Programa Nacional de Imunizações

pRb - Proteína do retinoblastoma

PRONEm - Programa de Apoio a Núcleos Emergentes

PV - *Papillomavirus*

qPCR – PCR quantitativa

RFLP - *Restriction fragment length polymorphism* (polimorfismo dos fragmentos de restrição)

RLB - *Reverse line blot* (hibridização reversa em linhas)

RNA - *Ribonucleic acid* (ácido ribonucléico)

mRNA – *Messenger RNA* (RNA mensageiro)

seg. - Segundos

SDS - *Sodium dodecyl sulphate* (duodecil sulfato de sódio)

SSPE - *Saline-Sodium Phosphate-EDTA* (Salina-Fosfato-EDTA)

SUS - Sistema Único de Saúde

TA - Temperatura ambiente

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

uds - Unidades

UV - Ultravioleta

VLP - *Virus Like Particles* (Partículas Similares a Vírus)

WHO - *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

2vHPV – Vacina bivalente

4vHPV – Vacina quadrivalente

9vHPV – Vacina nonavalente

µg - Microgramas

µL - Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	BREVE HISTÓRICO	20
2.2	DESCRIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO	20
2.2	ESTRUTURA E CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL.....	23
2.3	PATOGÊNESE E APRESENTAÇÕES CLÍNICAS.....	26
2.4	RELAÇÃO HPV-HIV.....	30
2.5	EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO E CÂNCER ANAL	30
2.6	VACINAS PROFILÁTICAS.....	32
2.7	RASTREAMENTO DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO.....	33
2.7.1	Métodos não moleculares.....	33
2.7.2	Métodos moleculares	34
2.8	BIOMARCADORES VIRAIS PARA LESÕES DE ALTO GRAU	38
2.8.1	Carga viral	38
2.8.2	Expressão de oncogenes virais E6 e E7	39
3.	JUSTIFICATIVA	41
4.	OBJETIVOS	43
4.1	OBJETIVO GERAL	43
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
5.	METODOLOGIA.....	44
5.1	ESTUDO, SELEÇÃO DAS AMOSTRAS, ESPÉCIMES CLÍNICOS E ASPECTOS ÉTICOS	44
5.1.1	Mulheres Quilombolas	45
5.1.2	Mulheres soropositivas para HIV	48
5.2	EXTRAÇÃO DO ÁCIDO NUCLÉICO	51
5.3	DETECÇÃO VIRAL.....	51

5.3.1	Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	51
5.4	DETERMINAÇÃO DO GENÓTIPO	53
5.4.1	Reverse Line Blot (RLB)	54
5.4.2	Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)	56
5.5	DETERMINAÇÃO DAS VARIANTES DE HPV16	56
5.6	DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL DOS HR-HPV	58
5.6.1	Padronização e preparo das curvas-padrão	60
5.7	QUANTIFICAÇÃO DE TRANSCRITOS DO ONCOGENE <i>E7</i>	64
5.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	65
6.	RESULTADOS	66
6.1	MANUSCRITO PUBLICADO	66
6.2	MANUSCRITOS A SEREM SUBMETIDOS	75
6.2.1	Resultados referentes à distribuição dos genótipos e variantes de HPV16 em mulheres HIV-positivas no Brasil.	75
6.2.2	Resultados referentes à carga viral e quantificação dos transcritos do oncogene E7 em indivíduos HIV-positivos e mulheres HIV-negativas...	91
7.	DISCUSSÃO	113
8.	CONCLUSÕES	119
	REFERÊNCIAS	120
	ANEXOS	136

1 INTRODUÇÃO

O papilomavírus humano (HPV) é constituído por mais de 200 diferentes genótipos (HPV CENTER, 2021). Cerca de 40 deles possuem tropismo pelo epitélio mucoso e são classificados conforme risco de progressão oncogênica em genótipos de baixo risco (LR-HPV), provável alto risco, alto risco (HR-HPV) ou risco indeterminado (IR-HPV) (MUÑOZ et al., 2006).

O HPV é o principal fator de risco para o desenvolvimento de cânceres anogenitais e está presente em aproximadamente 100% dos casos de câncer do colo do útero (CCU) e em 80-90% do câncer anal (CA) (DE VUYST et al., 2009; WALBOOMERS et al., 1999). Os HR-HPV16 e 18 são responsáveis pela maioria dos casos, seguidos pelos tipos 31, 33, 45, 52 e 58 (HOOTS et al., 2009; SMITH et al., 2007). Além do genótipo, outros fatores relacionados ao HPV, como subtipos e variantes, desempenham papel fundamental como adjuvantes na progressão maligna. As variantes são descritas dentro de um mesmo genótipo e podem diferir em suas propriedades biológicas e em seu potencial oncogênico (TORNESELLO et al., 2000, 2004; XI et al., 1997, 2002, 2007).

O CCU representa umas das principais causas de mortalidade em mulheres, sendo diagnosticados a cada ano mais de 500 mil novos casos, com uma mortalidade de cerca de 50% destes casos (BRUNI et al., 2019). Estima-se que no Brasil, em 2020, ocorreram cerca de 16.590 novos casos de CCU, correspondendo ao terceiro tipo de câncer mais frequente na população feminina (BRASIL, 2020a). Considerando a dimensão continental do Brasil, essas taxas variam entre as regiões, sendo o tipo de câncer mais incidente na região Norte (26,24/100 mil), o segundo nas regiões Nordeste (16,10/100 mil) e Centro-Oeste (12,35/100 mil), o quarto na região Sul (12,60/100 mil) e, na região Sudeste (8,61/100 mil), ocupa a quinta posição (BRASIL, 2020a).

Algumas populações são mais vulneráveis ao desenvolvimento deste tipo de câncer. Neste contexto tem-se as mulheres soropositivas para HIV cuja vulnerabilidade está relacionada à uma menor propensão para eliminar o HPV, agravado naquelas com contagem menor de células CD4, que possuem risco aumentado de desenvolvimento de lesões precursoras e câncer em relação às mulheres soronegativas para HIV (AHDIEH et al., 2001; CHIASSON et al., 1997; DUERR et al., 2001; HOLLY et al.,

2001; MCKENZIE et al., 2009). Podem ainda ser citadas, mulheres que vivem em precárias condições de vida e com dificuldade no acesso a serviços de saúde, como aquelas residentes em comunidades quilombolas, o que aumentaria o risco de desenvolvimento de doenças que podem ser prevenidas por meio de monitoramento, como o CCU.

O CA, por sua vez, é raro na população em geral, com uma incidência média de 1/100 mil e estimativa anual de 27 mil novos casos (BRUNI et al., 2019). Porém, a incidência é particularmente elevada entre as populações de homens que fazem sexo com homens, mulheres com história de CCU ou vulvar, e populações imunossuprimidas, incluindo aquelas soropositivas para HIV (BRUNI et al., 2019).

Como ações de controle do CCU, o Ministério da Saúde preconiza a prevenção, cuja principal medida é a vacina, e a detecção precoce ou rastreamento de lesões precursoras, por meio de exame citopatológico (BRASIL, 2020b). Em relação ao CA, não existem diretrizes ou ensaios clínicos randomizados baseados em evidências para fornecer recomendações adequadas de rastreamento (WELLS et al., 2014).

Três vacinas preventivas são aprovadas atualmente para uso: (i) a quadrivalente Gardasil® (4vHPV, Merck Sharp & Dohme - MSD), que protege contra a infecção pelos tipos HPV 6, 11, 16 e 18 e está incorporada no Programa Nacional de Imunizações (PNI) no Brasil, inclusive para mulheres soropositivas para HIV, de 9-26 anos; (ii) a bivalente Cervarix® (2vHPV, GlaxoSmithKline - GSK), que protege contra os tipos de HPV 16 e 18; e (iii) a nonavalente Gardasil 9® (9vHPV, MSD), contra os tipos HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58. Esta última vacina, reduziria cerca de 90% dos casos de CCU e condilomas no mundo (SERRANO et al., 2012). A vacina quadrivalente pode ter impacto menor na redução de CCU, conforme os genótipos que prevalecem em uma dada área geográfica.

O rastreamento do CCU no Brasil é realizado por meio do exame Papanicolaou anual, ou a cada três anos, após dois exames normais consecutivos anuais (BRASIL, 2020b). Nas mulheres soropositivas para HIV a periodicidade do exame é anual, após dois exames normais consecutivos realizados com intervalo semestral. Introduzido na década de 1940, o Papanicolaou levou a reduções substanciais na incidência e mortalidade deste câncer, principalmente em países com programas de rastreamento organizados (ARBYN et al., 2009). Entretanto, altas taxas têm sido observadas em

países onde o rastreamento é ausente, onde não há controle de qualidade ou é baixa a cobertura (VACCARELLA et al., 2013).

Apesar de ainda ser a modalidade mais utilizada para o rastreamento do câncer, a citologia tem baixa sensibilidade (50-70%), sendo necessárias repetições em intervalos mais curtos (DIJKSTRA et al., 2014; WENTZENSEN et al., 2016). Por outro lado, testes para HPV possuem sensibilidade de 20% a 45% maior na detecção de lesões pre-câncer do que a citologia (CASTLE et al., 2011; CUZICK et al., 2006; RONCO et al., 2010). Apenas uma única rodada de triagem utilizando teste para HPV poderia reduzir de forma eficaz a incidência de CCU em 4 a 5 anos e mortalidade em 8 anos (RIJKAART et al., 2012; RONCO et al., 2010; SANKARANARAYANAN et al., 2009). Esta alta sensibilidade dos testes para HPV permitem maiores intervalos de rastreamento e, atualmente tem sido implementado em alguns países na triagem primária ou em conjunto com a citologia (co-teste).

Entretanto, um teste positivo de HR-HPV, não necessariamente está vinculado a uma infecção persistente, e conseqüentemente, a um maior risco de progressão para lesão de alto grau ou câncer. Neste cenário, a análise de biomarcadores pode contribuir para a distinção de infecções de HR-HPV que resolveriam espontaneamente daquelas que iriam progredir para pré-câncer e câncer. Sendo assim, potencialmente, os biomarcadores poderiam aumentar a especificidade do teste de HPV e o intervalo de rastreamento.

Um biomarcador é um parâmetro que pode ser medido e avaliado, por exemplo, como preditor de um processo biológico normal ou patogênico (NAYLOR, 2003) e podem estratificar os indivíduos de acordo com o risco ou prognóstico (OGINO et al., 2013). De fato, carga viral, expressão de oncogenes virais, integração e metilação do genoma dos tipos oncogênicos de HPV têm emergido como potenciais preditores moleculares virais de lesão de colo uterino (MARONGIU et al., 2014; TORNESELLO et al., 2013). Além de contribuir para o entendimento da patogênese viral, uma melhor compreensão do papel destes possíveis biomarcadores no desenvolvimento do câncer anogenital pode ser útil para orientar futuros algoritmos de rastreamento e conseqüente redução da incidência deste câncer.

A carga viral do HPV, normalmente estimada pela quantidade de cópias do genoma viral por célula, tem sido associada à lesão no colo do útero. Estudos demonstraram que a carga viral do HPV16 foi capaz de diferenciar lesão intraepitelial de baixo grau

(LSIL) de lesão intraepitelial de alto grau (HSIL), LSIL de CCU e qualquer grau de lesão de amostras normais (BRIOLAT et al., 2007; CRICCA et al., 2007; SAUNIER et al., 2008; BOULET et al., 2009; HESSELINK et al., 2009). Entretanto, estudos com outros genótipos de HR-HPV são escassos (FLORES et al., 2006; MARONGIU et al., 2014; DEL RIO-OSPINA et al., 2015).

O potencial oncogênico do HPV envolve a expressão das oncoproteínas E6 e E7 dos HR-HPV, que interrompem as vias de sinalização de p53 e pRB, respectivamente, desregulando o controle do ciclo de replicação celular com consequente progressão da lesão. Portanto, além da presença de genes virais nas células hospedeiras, a expressão de mRNA E6 e E7 poderá ser também um biomarcador para a relação causal de HPV e oncogênese (DERBIE et al., 2020; MACEDO et al., 2019).

Considerando a persistência da infecção por HR-HPV como principal fator de risco para o desenvolvimento do CCU e a imunossupressão e a restrição ao rastreamento como favorecedores do CCU, investigamos os genótipos de HPV, as variantes gênicas do HPV16, carga viral e mRNA dos HR-HPVs correspondentes aos da vacina nonavalente em indivíduos HIV-positivos e negativos, um estudo de abrangência nacional, e em mulheres residentes em comunidades quilombolas do Norte do ES. Este estudo contribui, portanto, para o conhecimento dos genótipos de HPV e variantes de HPV16 prevalentes nessas populações e para a estimativa da proporção de mulheres que seria protegida pelas vacinas atualmente disponíveis. Além disso, uma melhor compreensão de potenciais biomarcadores de desenvolvimento de lesão cervical e anal pode ser útil para orientar futuros algoritmos de rastreamento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BREVE HISTÓRICO

Muitas doenças causadas por vírus têm sido descritas desde a antiguidade. No ano 400 a.C., relatos observacionais de verrugas na Grécia e Roma descreviam lesões condilomatosas cutâneas e genitais. Presumiu-se que verrugas eram supostamente transmissíveis e que as verrugas genitais estavam associadas à promiscuidade sexual (BURNS, 1992).

Em 1842, o médico italiano Rigoni-Stern foi o primeiro a formular a hipótese de que o CCU poderia estar relacionado com o comportamento sexual. Ele observou que a frequência de CCU era muito maior em prostitutas e mulheres casadas do que em freiras e virgens, concluindo que o desenvolvimento desse tipo de câncer poderia estar relacionado à transmissão sexual de um agente infeccioso (ZUR HAUSEN, 2009).

A primeira demonstração da natureza infecciosa de verrugas humanas resultou dos experimentos de Ciuffo em 1907, que inoculou um extrato preparado de filtrado de verrugas em sua própria mão (ZUR HAUSEN, 2009). Quase 25 anos depois, os pesquisadores Rous e Shope identificaram o primeiro papilomavírus (PV) em verrugas de coelhos e demonstraram sua transmissibilidade e potencial neoplásico (SHOPE; HURST, 1933; ROUS; BEARD, 1935). A demonstração em microscopia eletrônica de partículas virais do HPV foi alcançada em 1949 (STRAUSS et al., 1949).

Na década de 1970, Zur Hausen estabeleceu a relação entre o HPV e o CCU (ZUR HAUSEN, 1977), recebendo, em 2008, o Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina por suas descobertas.

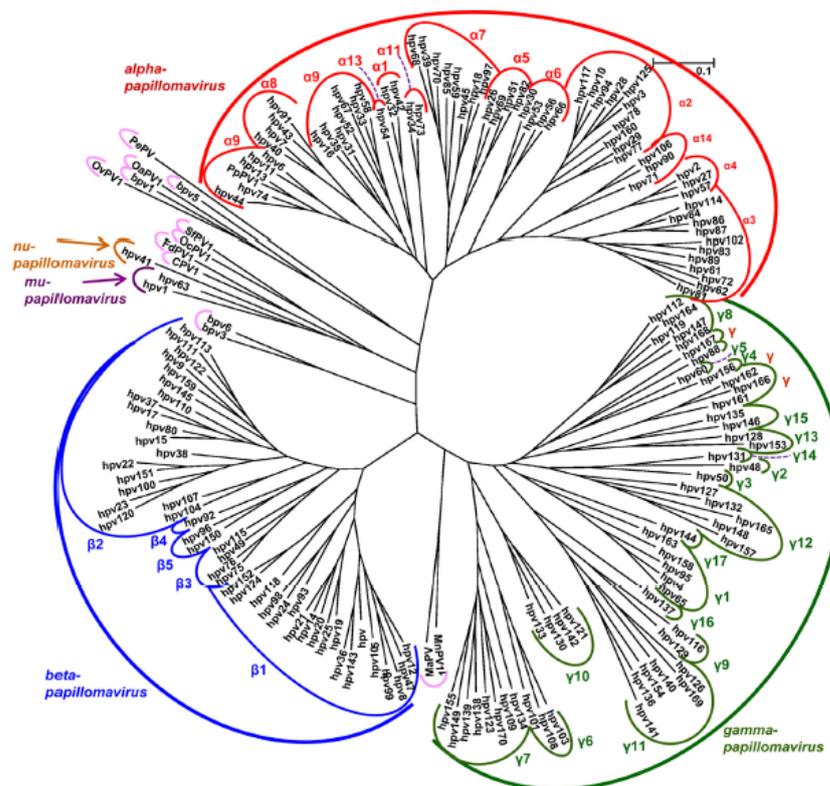
2.2 DESCRIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO

Pertencentes à família *Papillomaviridae*, os PV são vírus altamente espécie-específicos, isolados e caracterizados a partir de répteis, aves e mamíferos (BENNETT et al., 2010; BERNARD et al., 2010; HERBST et al., 2009; TERAI; DESALLE; BURK, 2002).

Os PV são classificados em gênero, espécie e genótipo com base na homologia da sequência de nucleotídeos da região *L1* de seu genoma (DE VILLIERS et al., 2004). Gêneros diferentes compartilham menos de 60% de similaridade e são designados por letras do alfabeto grego. Atualmente são descritos 53 gêneros, com os HPV pertencentes aos gêneros *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* e *Nupapillomavirus* (ICTV, 2021) (Figura 1). Espécies diferentes dentro de um mesmo gênero apresentam de 60% a 70% de similaridade e genótipos pertencentes a uma mesma espécie compartilham de 71% a 89% de similaridade. Diferenças de 2 a 10% caracterizam um novo subtipo viral e, menos de 2% de diferença configuram variantes de um determinado genótipo (BERNARD et al., 2010; DE VILLIERS et al., 2004).

Embora a classificação dos PV seja baseada na homologia genômica, as diferenças evolutivas entre os gêneros são, de certo modo, refletidas nas diferenças existentes na biologia e no tropismo celular dos diferentes vírus. Assim, HPV pertencentes ao gênero *Alphapapillomavirus* possuem tropismo pelo epitélio mucoso e cutâneo, enquanto os demais gêneros (*Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* e *Nupapillomavirus*) infectam células epiteliais cutâneas (DE VILLIERS, 2004).

Figura 1 – Árvore filogenética dos HPVs.



Análise filogenética baseada na sequência de L1 de 170 genótipos de HPV e outros papilomavírus animais (em rosa), evidenciando os gêneros e seus respectivos tipos.

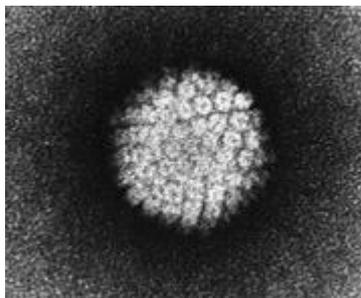
Fonte: DE VILLIERS, 2013.

Devido à sua importância, os HPV têm sido extensivamente estudados e mais de 200 genótipos foram identificados (HPV CENTER, 2021). Destes, cerca de 40 infectam a região anogenital, podendo ser classificados, de acordo com a sua capacidade para progressão oncogênica, em HPV de "alto risco" (HR-HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59), associados a um risco relativamente elevado de desenvolvimento de câncer, e de "baixo risco" (LR-HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e 89), associados a proliferações epiteliais benignas. Os genótipos 26, 53, 66, 68, 73 e 82 têm sido classificados em "prováveis cancerígenos", devido à estreita relação filogenética com os genótipos carcinogênicos estabelecidos, enquanto genótipos cuja oncogenicidade ainda não foi totalmente esclarecida (2a, 3, 7, 10, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 55, 57, 62, 67, 69, 71, 74, 77, 83, 84, 85, 86, 87, 90 e 91), em HPV de "risco indeterminado" (IR-HPV) (IARC, 2012; MUÑOZ et al., 2006).

2.2 ESTRUTURA E CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL

Os HPV são vírus não envelopados, com simetria icosaédrica e diâmetro de aproximadamente 55 nm (HOWLEY; LOWY, 2007) (Figura 2).

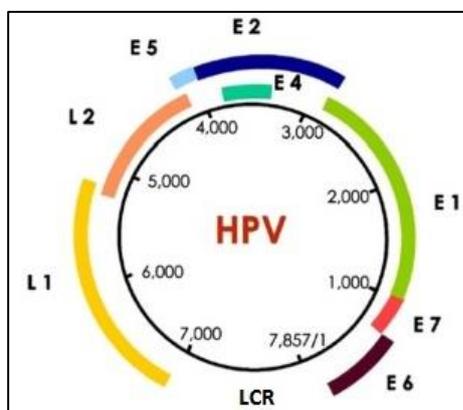
Figura 2 – Fotomicrografia eletrônica do HPV.



Fonte: National Cancer Institute, 2001.

Estes vírus apresentam um genoma constituído por DNA de dupla fita circular (DNA_{df}), com cerca de 8.000 pares de base (8 Kb) dividido em três regiões: (i) não codificadora (*LCR - long control region*), que contém sequências que controlam a transcrição e replicação viral; (ii) precoce (*E - early*), que possui regiões de leitura aberta (ORF) *E1* a *E7*, envolvida na ativação da transcrição, transformação, replicação viral e; (iii) tardia (*L - late*), envolvida na estrutura do vírion, empacotamento do DNA viral e maturação (BUCK et al., 2008; WILSON et al., 2002; ZHENG; BAKER, 2006) (Figura 3).

Figura 3 - Genoma do HPV, apresentado as regiões não codificadora (*LCR*), precoce (*E*) e tardia (*L*).

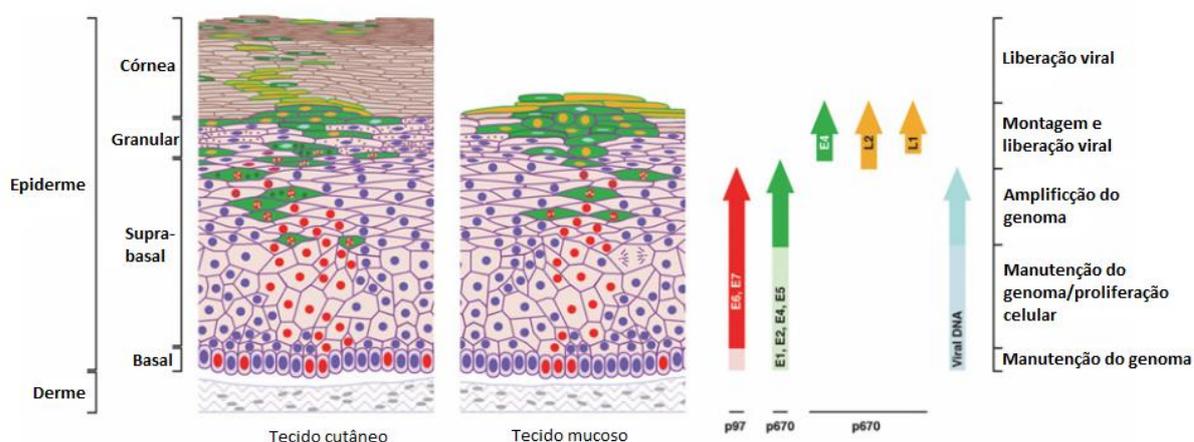


Fonte: MUÑOZ et al., 2006, adaptado.

As proteínas do HPV recebem o mesmo nome de seus genes: proteínas não-estruturais E (E1-E7), e proteínas estruturais L (L1 e L2). A proteína E3 é encontrada apenas no BPV-1 (*Bovine papillomavirus*) (SYRJÄNEM; SYRJÄNEM, 2000).

Os PV se caracterizam pelo tropismo por tecido epitelial estratificado cutâneo e mucoso. O ciclo infeccioso destes vírus é adaptado ao programa de diferenciação da célula alvo em que diferentes fases do ciclo viral acompanham a diferenciação dos queratinócitos. O vírus infecta as células basais, mas só expressa níveis elevados de proteínas nas camadas superiores do epitélio, onde ocorre a montagem viral (Figura 4). O tempo desde a infecção até a liberação das partículas virais é de aproximadamente três semanas, necessárias para que os queratinócitos basais sofram diferenciação completa e descamação (MIDDLETON et al., 2003; STANLEY, 1994; STERLING; SKEPPER; STANLEY, 1993).

Figura 4 - Expressão gênica do HPV, síntese de proteínas precoces (E) e tardias (L) e amplificação do genoma viral.



As diferentes camadas de células presentes no epitélio estão indicadas à esquerda. O tempo e a extensão da expressão das proteínas virais estão representados por setas à direita. As células da epiderme que expressam marcadores do ciclo celular são mostradas com núcleos vermelhos. A presença destas células acima da camada basal é consequência da infecção pelo vírus e, em particular, da expressão dos oncogenes virais *E6* e *E7*. A expressão de proteínas virais necessárias para a replicação do genoma ocorre em células que expressam *E6* e *E7*, após a ativação de *p670* nas camadas epiteliais superiores (células em verde com núcleos vermelhos). A expressão de *E6* e *E7* na presença de baixos níveis de *E1*, *E2*, *E4* e *E5* permite a manutenção do genoma viral (manutenção do genoma/proliferação celular). A elevação dos níveis das proteínas de replicação (*E1*, *E2*, *E4* e *E5*) facilita a amplificação do genoma viral. Os genes *L1* e *L2* (em amarelo) são expressos na porção superior do epitélio, permitindo empacotamento do genoma, montagem e liberação dos vírions. O acúmulo de *E4* próximo à superfície epitelial pode melhorar a eficiência da liberação do vírus. As células contendo partículas infecciosas são eventualmente eliminadas da superfície epitelial (células em verde com núcleos amarelos).

Fonte: DOORBAR, 2006, adaptado.

A infecção das células basais do epitélio escamoso queratinizado e não queratinizado ocorre quando a integridade destes é comprometida por uma microabrasão ou outros traumas (SCHILLER; DAY; KINES, 2010). Alguns estudos sugerem que a adsorção e internalização do vírus ocorram por meio de receptores na superfície celular, como proteoglicanos de heparam-sulfato e alfa-6-integrina, respectivamente (COMBITA et al., 2001; EVANDER et al., 1997; GIROGLOU et al., 2001; JOHNSON et al., 2009; SCHILLER; DAY; KINES, 2010).

Após a infecção, ocorre uma fase inicial de amplificação do genoma, e o HPV se estabelece nas células basais na forma epissomal e em baixo número de cópias (cerca de 200 cópias por célula) (MCBRIDE, 2008; PARISH et al., 2006; PYEON et al., 2009).

A proliferação de células basais e suprabasais é estimulada pelas proteínas E6 e E7 para permitir a amplificação do genoma viral, retardando a diferenciação do epitélio e ligando-se a proteínas reguladoras para estimular a progressão do ciclo celular (EGAWA et al., 2015; MUNGER et al., 2001; SHERMAN et al., 1997). Existem diferenças funcionais entre as proteínas E6 e E7 de HR-HPV e LR-HPV que contribuem para diferentes padrões de expressão gênica, desempenhando um papel importante na determinação do fenótipo da doença (KLINGELHUTZ; ROMAN, 2012). A proteína E7 se associa com membros da família de proteínas do retinoblastoma (pRb) que são reguladoras negativas do ciclo celular, normalmente impedindo a entrada da célula na fase S pela associação com fatores de transcrição da família E2F. A ligação de E7 à pRb desloca E2F, independentemente da presença de fatores de crescimento externos, e conduz à expressão de proteínas necessárias para a replicação do DNA celular (MUNGER et al., 1989; MOODY; LAIMINS, 2010). A proteína E6 complementa o papel de E7 e previne a indução de apoptose em resposta à entrada não programada da célula na fase S, por meio de sua ligação à proteína p53 (LECHNER; LAIMINS, 1994; PIM; BANKS, 2010).

A amplificação do genoma viral requer a expressão de todos os genes precoces virais (FEHRMANN; KLUMPP; LAIMINS, 2003; GENTHER et al., 2003) (Figura 4). A ligação de E2 à região *LCR* do HPV recruta a E1 DNA helicase para a origem de replicação viral, necessária para a replicação do DNA (MIDDLETON et al., 2003). As proteínas E4 e E5 contribuem indiretamente para a amplificação do genoma, modificando o ambiente celular. A E5 é uma proteína transmembrana capaz de interferir com a

apoptose e o tráfego intracelular de vesículas endocíticas, aumentando a sinalização mediada por receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (CRUSIUS; RODRIGUEZ; ALONSO, 2000; KABSCH et al., 2004; KRAWCZYK et al., 2010; THOMSEN et al., 2000).

Uma vez que a amplificação do genoma viral foi concluída, são expressas as proteínas L1 e L2, permitindo a montagem de partículas infecciosas nas camadas superiores do epitélio (Figura 4) (FLORIN et al., 2002; OZBUN; MEYERS, 1998). Os HPV são vírus não líticos e não são liberados até que as células infectadas atinjam a superfície epitelial. A proteína E4 pode contribuir diretamente para a saída do vírus na camada epitelial superior por alterar a integridade da queratina e a estrutura do envelope córneo (BRYAN; BROWN, 2000; DOORBAR et al., 1991; LEHR et al, 2004; WANG et al, 2004).

2.3 PATOGÊNESE E APRESENTAÇÕES CLÍNICAS

O HPV pode ser transmitido pelo contato direto ou indireto com o indivíduo infectado, por meio de traumatismos ou microabrasões na pele ou mucosa, possibilitando a infecção viral (LETO et al., 2011).

De acordo com o tipo viral e o sítio de infecção, o HPV pode estar associado a uma variedade de condições clínicas, que se dividem em lesões benignas e malignas. Lesões benignas incluem verrugas comuns, plantares, genitais (condiloma acuminado), papilomas (orais, laríngeos, orofaríngeos e conjuntivais), neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) e epidermodisplasia verruciforme (EV). As lesões malignas associadas ao HPV incluem os carcinomas de células escamosas de orofaringe e cânceres anogenitais (HOWLEY; LOWY, 2007; ZUR HAUSEN, 2002) (Quadro 1).

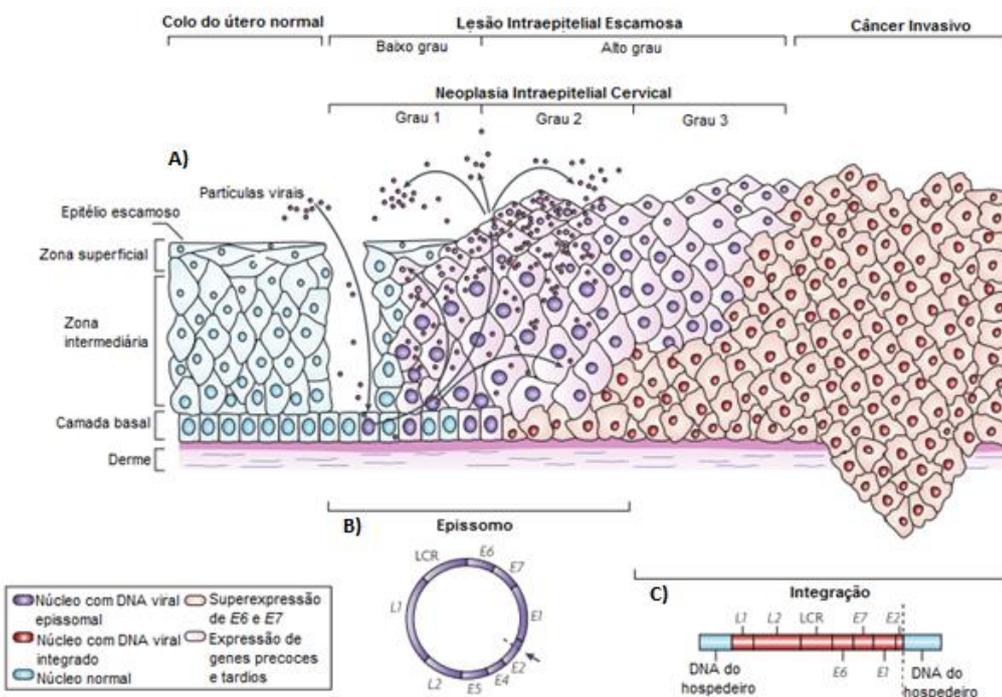
Quadro 1 – Genótipos de HPV e apresentações clínicas.

Sítio	Apresentação Clínica	Genótipos
Trato genital	Condiloma acuminado	6, 11, 42, 43, 51, 53 55, 83
	Câncer anogenital	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
	Neoplasia intraepitelial	6, 11, 16, 18, 26, 30, 31, 33, 34, 35, 39,40, 42, 43, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59,61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 73, 74, 79, 81, 82, 83, 84
Trato respiratório	Papiloma laríngeo	6, 11
Boca	Papiloma escamoso oral	6, 11
	Hiperplasia epitelial focal	13, 32
Pele	Verruga plantar	1, 2, 4
	Verruga comum	2, 4 e outros
	Verruga plana	3, 10, 28, 41
	Verruga do açougueiro	7
	Epidermodisplasia verruciforme	5, 8, 9, 12,14, 15, 17, 19-25, 36, 46, 47

Fonte: DE VILLIERS et al., 2004, adaptado.

Nas infecções do colo do útero, as células infectadas pelo HPV podem sofrer alterações citológicas de graus variados, desde LSIL, podendo progredir para HSIL, até o desenvolvimento do câncer (Figura 5). O HPV é encontrado em praticamente 100% dos casos de CCU (WALBOOMERS et al., 1999), cuja evolução está relacionada com a persistência do DNA viral e a integração ao genoma celular (BOSCH et al., 2002). O CCU é precedido por uma longa fase de doença pré-invasiva, categorizada como NIC de graus 1, 2 e 3, dependendo da proporção do epitélio que apresenta células diferenciadas (Figura 5). A maioria dos casos de CCU surge na zona de transformação, região do colo do útero que compreende inicialmente o epitélio colunar, mas que sofre metaplasia para formar uma camada epitelial escamosa diferenciada (SCHIFFMAN et al., 2016). As células da zona de transformação são mantidas por células de reserva, abundantes em sítios de metaplasia, e por células cuboidais, localizadas na junção escamo-colunar (JEC) do colo do útero (HERFS et al., 2013; MARTENS et al., 2009).

Figura 5 - Progressão de uma lesão benigna do colo do útero para câncer cervical invasivo.



A) Em LSIL (NIC1), após a infecção, ocorre a expressão de genes precoces e replicação do DNA viral na forma episossômica. Nas camadas superiores do epitélio, genes tardios são expressos, permitindo o empacotamento do genoma e liberação das partículas virais. B) A progressão para HSIL (NIC2 e 3) e câncer, está associada ao rompimento de E2. C) Integração do genoma do HPV ao cromossomo do hospedeiro, com aumento da expressão de E6 e E7 e diminuição da produção de partículas virais.

Fonte: WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007, adaptado.

O HPV também tem sido apontado como agente etiológico do CA. Este fato pode ser explicado pela presença de epitélio semelhante no canal anal e genital o que poderia favorecer a propagação do vírus nesses sítios (PALEFSKY; RUBIN, 2009). Desta forma, similarmente ao que ocorre no CCU, o CA é precedido por anormalidades celulares (LSIL e HSIL) ou neoplasia intraepitelias anais (NIAs), também categorizadas em graus 1-3 (PALEFSKY; RUBIN, 2009; SCHOLEFIELD; CASTLE; WATSON, 2005).

A expressão ordenada de genes que levam à produção de partículas virais é interrompida nas neoplasias associadas ao HPV. Nas NIC ocorrem mudanças no padrão de expressão das proteínas, assim como na replicação do HPV (DOORBAR, 2006). Em NIC1 quase não se observam alterações em relação ao epitélio normal; em NIC2 e 3, entretanto, há um atraso dos estágios tardios de replicação. Ainda, a replicação viral se restringe a uma área cada vez menor do epitélio até a não

expressão de proteínas tardias e consequente ausência na produção de vírions no CCU (DOORBAR, 2006) (Figura 5).

A probabilidade de aumento dos níveis de *E6* e *E7* é maior quanto maior for o grau de NIC e essas mudanças na expressão gênica refletem diretamente o fenótipo neoplásico. A expressão aumentada de *E6* e *E7* na infecção por HR-HPV, que conduz às lesões de alto grau NIC2+ (NIC2 ou NIC3), predispõe a célula ao acúmulo de alterações genéticas que contribuem para a progressão ao câncer. Desta forma, níveis relativamente mais baixos de *E6* e *E7* presentes em NIC1 não comprometem as funções de seus alvos celulares suficientemente para conduzir ao câncer. A desregulação gênica observada em NIC2+ parece facilitar a integração do epissoma viral ao cromossomo da célula hospedeira. Nesses casos, a expressão gênica desregulada pode ser acionada por alterações na sinalização celular, alterações hormonais, ou modificações epigenéticas, tais como a metilação do DNA viral (DING et al., 2009; GARIGLIO et al., 2009).

Sítios frágeis comuns (CFS - *common fragile sites*) no genoma da célula hospedeira são considerados *hot spots* onde a integração é mais provável de ocorrer (THORLAND et al., 2003), resultando no rompimento de genes virais que regulam a transcrição normal. Um dos mais importantes, o gene *E2*, age como um fator de transcrição que regula a expressão de *E6* e *E7*. Integração e perda de regulação em *E6/E7* pode facilitar a expressão persistente de alto nível destes oncogenes (JEON; ALLEN-HOFFMANN; LAMBERT, 1995; JEON; LAMBERT, 1995) e o acúmulo de erros genéticos que, eventualmente, conduzem ao câncer (PETT et al., 2004). Ainda não está claro se os eventos de integração precoce em NIC1 conduziriam à progressão de NIC2 e NIC3 ao câncer ou se algum grau de desregulação na expressão de genes virais causaria instabilidade cromossômica e, assim, facilitaria a integração. Em geral, acredita-se que a integração ocorra em lesões de alto grau (NIC2+), e uma vez ocorrida, faz com que a expressão já desregulada de *E6* e *E7* possa aumentar ainda mais ou então ser mantida a um nível constitutivo (HAFNER et al., 2008; MELSHEIMER et al., 2004). A expressão a longo prazo e, em particular, a superexpressão de *E6* e *E7* e o acúmulo de mutações genéticas, são em última instância importantes na progressão de NIC3 para o câncer (DOORBAR et al., 2012).

2.4 RELAÇÃO HPV-HIV

A infecção pelo HIV altera a história natural da infecção pelo HPV, diminuindo as taxas de regressão de LSIL e aumentando risco de progressão para HSIL e câncer invasivo, tornando necessárias mais intervenções e acompanhamento (NAUCLER et al., 2007; SUN et al., 1997). Mulheres HIV-positivas são mais vulneráveis à infecção por HPV e possuem menor propensão em eliminar este vírus, o que aumenta o risco de desenvolvimento de lesões e câncer nessa população (CHIASSON et al., 1997; MCKENZIE et al., 2009). Aquelas com contagens de células T CD4+ mais baixas possuem ainda uma maior prevalência de infecção por HPV cervical e de cânceres relacionados com o HPV (AHDIEH et al., 2001; DUERR et al., 2001; HOLLY et al., 2001; SUN et al., 1997).

Um mecanismo envolvido na interação entre HPV e HIV é a modulação da resposta imunológica. A imunidade mediada por células desempenha um papel fundamental na regressão de lesões intraepiteliais, sendo evidenciada pela presença de infiltrado tecidual de células T CD4+, células T CD8+ e macrófagos antes da resolução de LSIL (VAN DER BURG; PALEFSKY, 2009). Sendo assim, a depleção de células T CD4+ presente em pessoas infectadas pelo HIV contribui para a patogênese do HPV.

Entretanto, outros mecanismos também podem explicar o aumento da prevalência e progressão da doença associada ao HPV em indivíduos HIV-positivos. O HIV pode facilitar a infecção por HPV por meio de do rompimento das *tight junctions* epiteliais, devido à secreção das proteínas virais tat e gp120 pelas células infectadas pelo HIV. Foi demonstrado que essas proteínas aumentaram a passagem de pseudovirions de HPV16 para a camada basal celular, onde a infecção inicial é estabelecida (TUGIZOV et al., 2013). O HIV pode ainda interagir com o HPV em nível molecular por meio da ação da proteína tat, que demonstrou regular a expressão de *E6* e *E7* em queratinócitos humanos infectados com HPV16, *in vitro*, facilitando o desenvolvimento de HSIL (KIM et al., 2008).

2.5 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO E CÂNCER ANAL

O HPV tem sido detectado em 99% dos CCU e em 80-90% dos CA, sendo considerado o principal fator de risco para o desenvolvimento de cânceres anogenitais

(DE VUYST et al., 2009; WALBOOMERS et al., 1999). Os HR-HPVs apresentam maior probabilidade de causar lesões persistentes e de estar associados a lesões pré-cancerosas. Os HR-HPV16 e 18 são responsáveis pela maioria dos casos, seguidos pelos tipos 31, 33, 45, 52 e 58 (HOOTS et al., 2009; SMITH et al., 2007). Outros fatores relacionados ao vírus, como carga viral e aumento na expressão de oncogenes também podem desempenhar importante papel na progressão maligna e serão discutidos nas próximas seções (item 2.8).

O CCU representa umas das principais causas de mortalidade em mulheres, sendo diagnosticados 569.847 novos casos e 311.365 mortes em 2018 (BRUNI et al., 2019). A maioria dos CCU corresponde ao carcinoma de células escamosas, seguido de adenocarcinoma. No Brasil, o CCU é o terceiro tipo mais comum em mulheres, com aproximadamente 16.590 novos casos estimados em 2020, correspondendo a 41% de todos os casos de CCU na América do Sul (BRASIL, 2020a; BRUNI et al., 2019).

Regionalmente, o CCU é o de maior incidência na região Norte (26,24/100 mil), onde também se evidenciam as maiores taxas de mortalidade do país, representando a primeira causa de óbito por câncer feminino nesta região. Nas regiões Nordeste e Centro-Oeste o CCU ocupa a segunda posição com incidências de 16,10/100 mil e 12,35/100 mil, respectivamente. Na região Sul (12,60/100 mil), o CCU ocupa a quarta posição e na região Sudeste (8,61/100 mil), a quinta posição. No Espírito Santo, entretanto, a incidência do CCU em 2020 foi de 11,65/100 mil (BRASIL, 2020a).

O CA é raro na população em geral, com uma incidência média de 1/100 mil e estimativa anual de 27 mil novos casos (BRUNI et al., 2019). Porém, a incidência é particularmente elevada entre as populações de HSH, mulheres com história de CCU ou vulvar, e populações imunossuprimidas, incluindo aquelas soropositivas para HIV e pacientes com história de transplante de órgãos (BRUNI et al., 2019).

Estudos epidemiológicos e etiológicos do câncer para investigar a transmissão de HPV intra e entre populações são realizados considerando variantes gênicas (TORNESELLO et al., 2007; XI et al., 2006). Foi demonstrado mais claramente para as variantes de HPV16, que diferem em distribuição geográfica, em suas propriedades biológicas e em seu potencial oncogênico (TORNESELLO et al., 2000, 2004; XI et al., 1997, 2002, 2007). Essas variantes são classificadas filogeneticamente com base em sua origem geográfica, em variantes Europeia (E), Africana (Af), Asiática (As), Asiático-americana (AA) e Norte-americana (NA) (HO et al., 1993; YAMADA et al.,

1995). Um maior potencial oncogênico tem sido descrito para as variantes não Europeias (FREITAS et al., 2014; SICHERO et al., 2007).

2.6 VACINAS PROFILÁTICAS

Embora baixos níveis de anticorpos neutralizantes sejam induzidos na infecção natural pelo HPV, as estratégias atuais das vacinas preventivas se baseiam na proteína L1 do capsídeo viral como antígeno alvo para indução dos anticorpos neutralizantes. A expressão de L1 recombinante resulta em montagem espontânea de VLP, que são imunologicamente e morfológicamente semelhantes à partícula viral do HPV (KIRNBAUER et al., 1992; ROSE; REICHMAN; BONNEZ, 1994; ZHOU et al., 1991).

Três vacinas preventivas são aprovadas atualmente para uso (Quadro 2). A vacina quadrivalente, Gardasil® (HPV4, Merck Sharp & Dohme - MSD), protege contra a infecção por HPV genótipos 6, 11, 16 e 18. Esta vacina foi licenciada em 2006 para uso em mulheres com idade entre nove e 26 anos para a prevenção de CCU, cânceres vaginal e vulvar (FDA, 2009). Em 2009, o licenciamento foi ampliado para incluir também os homens nesta faixa etária (CDC, 2010). A vacina bivalente, Cervarix® (HPV2, GlaxoSmithKline - GSK), fornece proteção contra os genótipos de HPV 16 e 18 e é utilizada na prevenção do CCU (VILLA, 2006). Em 2014, o *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou a vacina nonavalente Gardasil 9® (HPV9, MSD), produzida usando tecnologia similar à da vacina quadrivalente (Quadro 2). Essa vacina é dirigida contra nove genótipos de HPV (HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58), que juntos causam cerca de 90% dos casos de CCU e condilomas no mundo (FDA, 2014).

Desde 2009, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que a vacina contra o HPV seja incluída em programas nacionais de imunização (WHO, 2009). No Brasil, o Ministério da Saúde aprovou o uso das vacinas quadrivalente e bivalente em agosto de 2006 e fevereiro de 2008, respectivamente. Atualmente a vacina quadrivalente está incorporada ao PNI e é ofertada pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para meninas de nove a 14 anos e meninos de 11 a 14 anos, podendo ser estendida até os 26 anos conforme disponibilidade da vacina. É ofertada, ainda, para pessoas com HIV/AIDS, pacientes transplantados e pacientes oncológicos (BRASIL, 2020c).

Quadro 2 - Comparação entre as vacinas atualmente disponíveis.

Características	Bivalente	Quadrivalente	Nonavalente
Nome comercial	Cervarix™	Gardasil®	Gardasil® 9
VLP	16, 18	6, 11, 16, 18	6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58
Fabricante	GlaxoSmithKline	Merck and Co., Inc	Merck and Co., Inc
Antígeno – fonte	Baculovirus	Levedura	Levedura
Adjuvante	Al(OH) ₃ , Monofosforil Lipídeo A	Sulfato hidroxifosfato de alumínio amorfo AAHS	Sulfato hidroxifosfato de alumínio amorfo AAHS
Administração	0,5 mL, intramuscular	0,5 mL, Intramuscular	0,5 mL, intramuscular
Idade aprovada (anos)	10-25*	Mulheres: 9-26 Homens: 9-15	Mulheres: 9-26 Homens: 9-15

*Apenas para mulheres

Fonte: PETROSKY et al., 2015, adaptado.

2.7 RASTREAMENTO DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO

O objetivo do rastreamento do CCU é detectar e tratar precocemente lesões pré-câncer, reduzindo assim a morbidade e a mortalidade (WENTZENSEN et al., 2016). Atualmente existem três estratégias principais para o rastreamento do CCU: citologia, detecção molecular do HPV e o co-teste (associação da citologia com detecção molecular) (WENTZENSEN; SCHIFFMAN, 2014). O rastreamento baseado na citologia ainda é a abordagem mais amplamente utilizada, entretanto, exige intervalos mais curtos de rastreamento para alcançar uma boa sensibilidade quando comparada àquela dos testes moleculares para HPV, que apresentam maior sensibilidade e ampliação dos intervalos de rastreamento (WENTZENSEN et al., 2016).

A seguir, serão descritos tanto métodos não moleculares, que detectam as alterações morfológicas provenientes da infecção pelo HPV, quanto moleculares, capazes de detectar o DNA do HPV ou seus transcritos na amostra.

2.7.1 Métodos não moleculares

Introduzido por Papanicolaou em 1940, o exame citopatológico de mesmo nome consiste no estudo das células esfoliadas da ecto e endocérvice para identificação de alterações celulares benignas e malignas, sendo utilizado para identificação de lesões precursoras do CCU. A nomenclatura para as alterações citológicas utiliza

terminologia proposta pelo Sistema de Bethesda (1991), revista em 2001 (SOLOMON et al., 2002), e diferencia entre lesão de alto e baixo grau, com distinção explícita entre efeito da infecção pelo HPV (LSIL) e efeito precursor do CCU (HSIL). Além disso, incorpora os termos ASCUS (células escamosas atípicas de significado indeterminado) e ASC-H (células escamosas atípicas, não se podendo excluir lesão intraepitelial escamosa de alto grau).

A colposcopia, exame visual especializado do colo uterino, vagina e vulva, é realizada após a constatação da presença de alterações citológicas, com a finalidade de delimitar a extensão da lesão e, se necessário, realizar a biópsia para confirmar o diagnóstico (IARC, 2005). O exame histopatológico, realizado em amostras obtidas de uma superfície suspeita de presença de lesão ou malignidade, é utilizado para confirmar a gravidade da lesão, sendo definitivo para o diagnóstico de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas no colo uterino. A nomenclatura histológica utilizada atualmente é a proposta por Richart (1972), baseada em NIC 1, 2 e 3 (SCHIFFMAN; WENTZENSEN, 2013).

2.7.2 Métodos moleculares

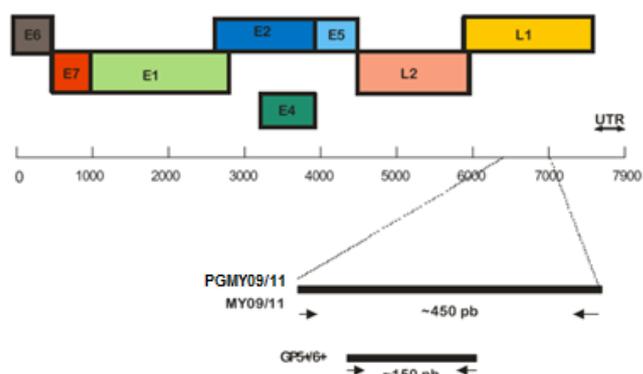
A relação causal entre o HPV e CCU estimulou o desenvolvimento de técnicas moleculares baseadas na identificação de DNA ou RNA de HR-HPV (ABREU et al., 2012). A principal vantagem da utilização do teste de HPV é a alta sensibilidade e alto valor preditivo negativo, uma vez que a ausência de HR-HPV indica um risco extremamente baixo de NIC3 ou câncer (ARBYN et al., 2012; MEIJER et al., 2009).

Atualmente, existe uma grande variedade de testes de HPV disponíveis comercialmente baseados em hibridização, amplificação de sinal e amplificação de ácido nucleico (LUHN; WENTZENSEN, 2013), cinco deles aprovados pela FDA para o rastreamento do CCU: Captura híbrida[®] 2 (Qiagen), Cervista[®] HR-HPV (Hologic), Cervista[®] HPV 16/18 (Hologic), Cobas[®] 4800 HPV (Roche Diagnostics) e APTIMA[®] HPV Assay (Gen-Probe).

Embora vários métodos estejam disponíveis, os laboratórios clínicos e de pesquisa utilizam principalmente ensaios baseados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detectar e identificar o DNA do HPV. Os protocolos mais amplamente utilizados empregam *primers* consenso que são dirigidos a uma região altamente

conservada do gene *L1*, incluindo MY09/11, PGMY09/11 e GP5+/6+ (Figura 6). Estes *primers* são capazes de detectar até 40 genótipos diferentes de HPV (DENNY; WRIGHT, 2005).

Figura 6 - Genoma do HPV apresentado de forma linear.

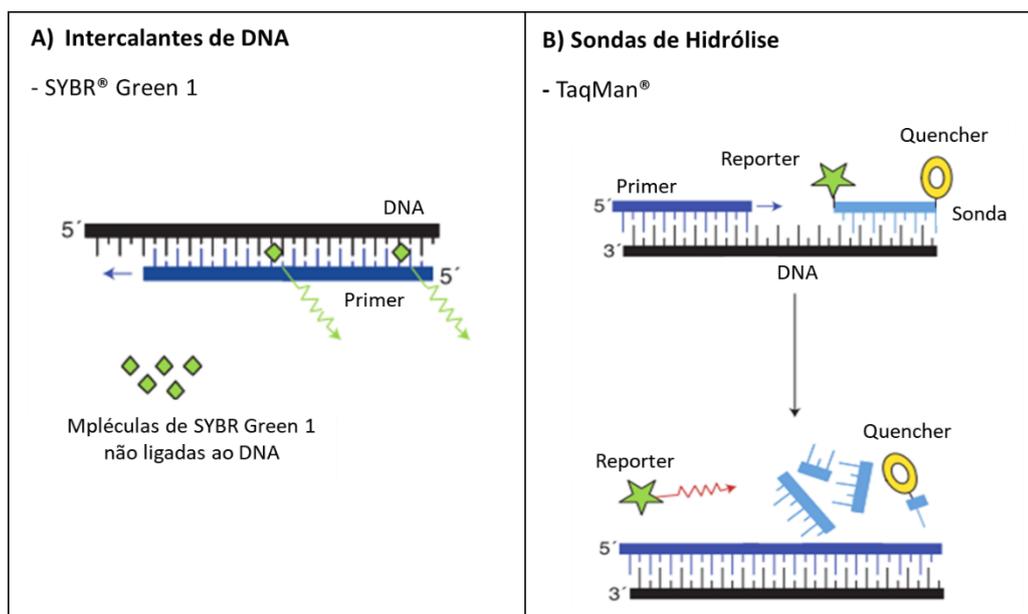


A posição do início dos genes precoces (*E*), tardios (*L*), e da região não traduzida (*LCR*) está indicada, bem como as posições dos *primers* mais amplamente utilizados: MY09/11 (MANOS et al., 1989), PGMY (GRAVITT et al.; 2000) e GP5+/6+ (de RODA HUSMAN et al., 1995).

Fonte: MOLIJN et al. 2005, adaptado.

A PCR em tempo real, descrita por Higuchi e colaboradores (1993), é uma variação da PCR convencional, com a possibilidade de detecção em tempo real do DNA amplificado em cada ciclo de amplificação, por meio de detecção com diversos agentes fluorescentes (NAVARRO et al., 2015). Entre estes, os mais empregados são os intercalantes de DNA, destacando-se a tecnologia SYBR® Green I, e as sondas de hidrólise, tais como o sistema TaqMan® (HOLLAND et al., 1991; NAVARRO et al., 2015. PELT-VERKUIL; VAN BELKUM; HAYS, 2008; RIRIE; RASMUSSEN; WITTEWER, 1997) (Figura 7). Por ser uma ferramenta de diagnóstico sensível e específica, ensaios baseados na PCR em tempo real têm sido empregados na pesquisa do HPV em espécimes clínicos. Além da detecção do DNA de HPV, as principais aplicações deste método são: (i) genotipagem, por meio do uso de diferentes fluorocromos, (ii) expressão gênica e (iii) determinação da carga viral (ABREU et al., 2012).

Figura 7 – Mecanismo de ação dos intercalantes de DNA e sondas de hidrólise.



A) O corante intercalante de DNA SYBR® Green 1 exibe pouca fluorescência quando não está ligado ao DNA. Durante a extensão e a polimerização do *primer*, as moléculas do corante intercalam-se ao DNA de dupla fita, resultando em um aumento na fluorescência detectada. B) Protocolo Taqman®: Após a desnaturação, o primer e a sonda hibridizam complementarmente ao DNA. Na sonda intacta, o *reporter* e o *quencher* permanecem próximos um do outro impedindo a emissão de fluorescência. Durante a fase de extensão, a atividade de exonuclease 5'-3' da Taq DNA polimerase cliva a sonda separando o *reporter* e o *quencher*, permitindo a emissão e detecção da fluorescência.

Fonte: ARYA et al., 2005, adaptado.

A genotipagem do HPV pode ser realizada por meio de técnicas baseadas em PCR que permitem a análise dos produtos amplificados por eletroforese em gel, *dot blot* ou hibridização, de polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP) ou por sequenciamento (DENNY; WRIGHT, 2005).

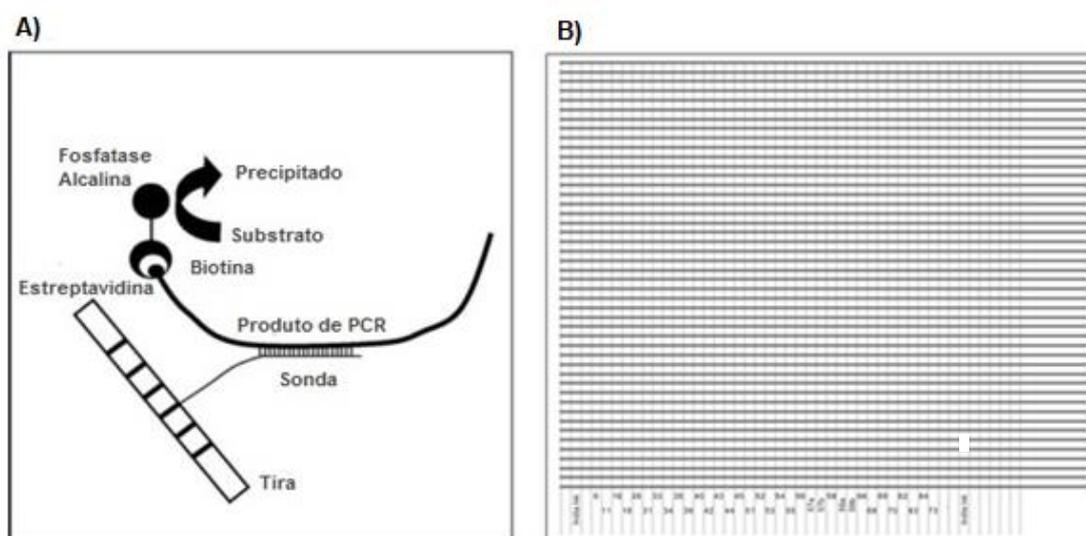
O método de RFLP é utilizado para tipagem de HPV e consiste na digestão do produto de 450 pb com as enzimas de restrição *Bam*HI, *Dde*I, *Hae*III, *Hin*fI, *Pst*I, *Rsa*I e *Sau*3A, gerando um perfil de fragmentos que é específico para cada tipo de HPV (BERNARD et al., 1994) (ANEXO A). Este método é capaz de detectar 44 tipos anogenitais, porém com a limitação na determinação dos tipos quando em infecção mista devido ao grande número de fragmentos gerados pelas enzimas de restrição.

A hibridização de ácidos nucleicos é um método sensível que, além de poder ser usado para a detecção de HPV em amostras clínicas, é capaz de identificar genótipos específicos de HPV. A Hibridização Reversa em Linhas (*Reverse Line Blot* - RLB),

validada por Estrade e colaboradores (2011), é um método *in house* descrito no Manual de Laboratório de HPV da OMS (WHO, 2010), particularmente útil para a detecção de infecções específicas e de múltiplos genótipos, pois permite testar até 45 amostras em apenas uma reação, para 32 diferentes genótipos de HPV mucosos (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 66, 68, 69, 70, 73, 82, 83 e 84). A técnica consiste na hibridização do produto de PCR biotinilado com as sondas de oligonucleotídeos imobilizadas em uma membrana de *nylon*, perpendicularmente. Os híbridos podem ser detectados pela adição de um conjugado de estreptavidina e substrato, gerando uma reação quimiluminescente revelada em um filme radiográfico (ESTRADE et al., 2011) (Figura 8)

Diferentemente dos kits comerciais de hibridização reversa, como o INNO-LiPA HPV Genotyping Extra® (Innogenetics) e o Linear Array® (Roche Diagnostics), a RLB permite a reutilização da membrana contendo as sondas, tornando essa técnica altamente custo-efetiva e reprodutível (ESTRADE et al., 2011).

Figura 8 - Esboço e exemplo de hibridização reversa.



A) amplicons são desnaturados e hibridizados com sondas imobilizadas como linhas paralelas. Após lavagem rigorosa, os híbridos são detectados por estreptavidina conjugada com enzima e um substrato, obtendo-se uma reação de cor. B) Esquema da membrana indicando a distribuição de sondas em canais adjacentes (delimitados por listras cinza claro). Listras em cinza escuro indicam os canais perpendicularmente após a rotação da membrana em 90°, de modo que cada amplicon da reação entre em contato com cada sonda.

Fonte: MOLIJN et al., 2005; WHO, 2010, adaptado.

O sequenciamento de Sanger permite a leitura de fragmentos de DNA de 500 pb a 1 kb de comprimento e tem sido utilizado para tipagem do HPV, sendo considerados “padrão ouro” por permitir a identificação de praticamente todos os genótipos, inclusive novos e raros (FONTAINE et al., 2007). Entretanto, quando a amostra clínica contém múltiplos genótipos, a identificação da sequência do DNA não é adequada, podendo subestimar a prevalência dos tipos, uma vez que pode ocorrer a amplificação apenas do tipo de maior prevalência na amostra (MOLIJN et al., 2005). Além da genotipagem, por meio da técnica de sequenciamento, variantes de HPV podem ser identificadas, em particular no caso do HPV16, cujas alterações nucleotídicas em *E6*, *L1*, *L2* e *LCR* determinam as diversas variantes que apresentam diferentes distribuições geográficas e pontencial oncogênico (BERNARD; CALLEJA-MACIAS; DUNN, 2005; YAMADA et al., 1995, 1997).

2.8 BIOMARCADORES VIRAIS PARA LESÕES DE ALTO GRAU

Apesar da alta sensibilidade, os testes para HPV não discriminam se a infecção é ativa ou transitória. Deste modo, biomarcadores que identificam estágios específicos na história natural da infecção pelo HPV e progressão ao câncer emergem como ferramentas importantes para a identificação de indivíduos com maior risco de progressão para lesões pré-câncer ou câncer. (TORNESELLO et al., 2013). Dentre esses biomarcadores, podemos destacar a carga viral e a expressão os oncogenes virais *E6* e *E7*, brevemente descritos a seguir.

2.8.1 Carga viral

A carga viral do HPV, representada pelo número de cópias do genoma, tem sido associada em alguns estudos com lesão do colo do útero. Isso porque diferenças na carga viral observadas entre as anormalidades citológicas podem indicar que são necessários níveis variáveis de replicação viral para interromper a homeostase celular e induzir alterações biológicas que levam à doença cervical (FLORES et al., 2006). Além disso, é possível que essas variações na replicação viral possam divergir entre os diferentes tipos de HPV para induzir lesões cervicais (FLORES et al., 2006).

A maioria dos estudos avaliaram a carga viral do HPV16 e demonstraram que seu aumento foi associado a lesão cervical e capaz de diferenciar LSIL de HSIL, CCU de LSIL e qualquer grau de doença de amostras normais (BRIOLAT et al., 2007; CRICCA et al., 2007; SAUNIER et al., 2008; BOULET et al., 2009; HESSELINK et al., 2009). Entretanto, estudos com outros genótipos de HR-HPV são escassos na literatura (FLORES et al., 2006; MARONGIU et al., 2014), bem como estudos avaliando carga viral e lesão anal (JIN et al., 2017; MARRA et al., 2018; PIERANGELI et al., 2008; TAMALET et al., 2014).

2.8.2 Expressão de oncogenes virais E6 e E7

Os testes baseados na detecção de RNA são capazes de identificar diferenças ou alterações na expressão gênica relacionadas ao desenvolvimento do câncer (EBISCH et al., 2016). A transformação das células infectadas por HR-HPV é regulada pelo aumento de mRNA E6 e E7 (DOORBAR, 2007). A transcrição desses genes nos HR-HPV ocorre a partir de um mesmo promotor em um único pré-RNA E6/E7 bicistrônico (ZHENG; BAKER 2006). A ORF E6 neste pré-mRNA bicistrônico contém um íntron que está sujeito a *splicing* alternativo, importante para a tradução da proteína E7 (ZHENG et al. 2004; ZHENG; BAKER, 2006; TANG et al. 2006). Como descrito anteriormente, a expressão das oncoproteínas E6 e E7 regula a progressão do ciclo celular, promovido pela interação com as proteínas supressoras de tumor p53 e pRb, respectivamente (LECHNER; LAIMINS, 1994; MOODY; LAIMINS, 2010; MUNGER et al., 1989; PIM; BANKS, 2010).

Baseadas nessas informações, estudos mostram que a detecção de transcritos de E6 e E7 está relacionada à presença de lesões cervicais de alto grau, sendo considerado um potencial biomarcador de lesão e CCU (DERBIE et al., 2020; MACEDO et al., 2019).

Atualmente, alguns ensaios comerciais estão disponíveis para detecção de mRNA do HPV em amostras cervicais, dentre eles: (i) APTIMA (GenProbe) e OncoTect (IncellDX) baseam-se na utilização de transcriptase reversa e PCR e detectam mRNA E6/E7 de 14 e 13 HR-HPV, respectivamente; (ii) PreTect HPV-Proofer (Norchip) e NucliSENS EasyQ (Biomerieux), ambos baseados na amplificação de sequência de

ácidos nucleicos (NASBA), são capazes de detectar transcritos E6/E7 dos cinco HR-HPV mais comuns (HPV 16, 18, 31, 33 e 45) (WHO, 2020).

3. JUSTIFICATIVA

O HPV é responsável por praticamente 100% dos casos de CCU, uma das principais causas de morte por câncer em mulheres no Brasil (BRASIL, 2020a). Algumas populações são mais vulneráveis ao desenvolvimento deste tipo de câncer, como mulheres soropositivas para HIV, aquelas com baixo nível educacional e com acesso restrito a serviços de saúde. O CA, por sua vez, é raro na população em geral, e incide mais em HSH e em indivíduos soropositivos para HIV (BRUNI et al., 2019).

Embora o exame citológico de Papanicolaou seja aplicado como estratégia secundária para rastreamento do CCU há mais de 50 anos na população brasileira, a sua incidência e a mortalidade ainda permanecem elevadas, parte devido à limitação na sua sensibilidade e parte devido à baixa cobertura de rastreamento. Quanto ao CA, não há diretrizes ou ensaios clínicos randomizados para fornecer rastreamento adequado (WELLS et al., 2014). Como estratégia de prevenção primária, a vacinação para HPV no Brasil foi implementada pelo PNI para mulheres e homens por meio da vacina 4vHPV. Esta estratégia de prevenção passa então a exigir mudanças no rastreamento do câncer anogenital por metodologias que sejam mais sensíveis para a detecção de lesões do colo uterino e anal.

Neste sentido, alguns países têm adotado testes moleculares de detecção do HPV, que apresentam elevada sensibilidade. Combinado com exame citológico, estes testes são atrativos como triagem de câncer anogenital. Adicionalmente, aqueles que são capazes de quantificar a carga viral e expressão de oncogenes do HPV, por exemplo, aumentam a sensibilidade e especificidade na detecção de lesões e emergem como biomarcadores virais, permitindo distinguir infecções transitórias daquelas persistentes e com maior propensão em progredir para o câncer (GRAVITT et al., 2007; MARONGIU et al., 2014; SCHLECHT et al., 2003).

Destarte, investigamos neste estudo: (i) os genótipos de HR-HPV em populações femininas de maior vulnerabilidade para câncer anogenital, sendo elas positivas para HIV, das cinco regiões geográficas do Brasil, e mulheres negras quilombolas residentes em comunidades rurais do norte do Espírito Santo; e (ii) a carga viral dos HR-HPV correspondentes aos da vacina 9vHPV e de mRNA E7 como possíveis biomarcadores de lesões cervicais e anais de indivíduos HIV-positivos e negativos.

Os resultados obtidos contribuem para orientar algoritmos de rastreamento e de controle do câncer anogenital específicas para essas populações vulneráveis.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo determinar os genótipos de HPV em populações de mulheres vulneráveis (HIV-positivas e quilombolas) e investigar se carga viral e quantificação de transcritos do oncogene *E7* (mRNA *E7*) dos HR-HPV correspondentes aos da vacina nonavalente (9vHPV) estão relacionadas com lesões cervicais e anais de indivíduos HIV-positivos e negativos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a frequência de HPV e de genótipos de HR-HPV encontrados em populações de mulheres quilombolas e HIV-positivas;
- Descrever as variantes de HPV16 predominantes nas populações de mulheres HIV-positivas;
- Investigar se a carga viral e dos transcritos do oncogene *E7* dos HR-HPV incluídos na vacina nonavalente (HPV16, 18, 31, 33, 45, 52, 58) se relacionariam com lesões do colo uterino ou anal e poderiam ser utilizados como biomarcadores virais de lesão.

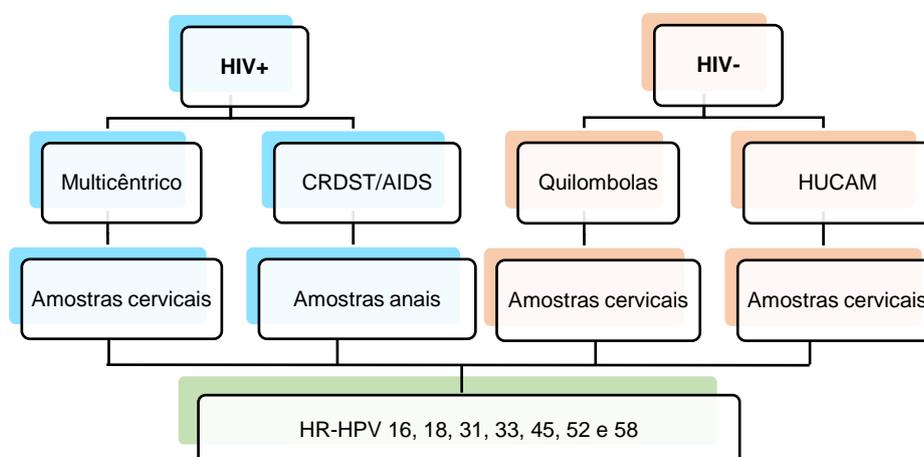
5. METODOLOGIA

5.1 ESTUDO, SELEÇÃO DAS AMOSTRAS, ESPÉCIMES CLÍNICOS E ASPECTOS ÉTICOS

Este é um estudo descritivo, em corte transversal, conduzido em amostras de escovado de colo uterino de mulheres HIV-negativas, residentes em comunidades quilombolas, e de mulheres HIV-positivas de oito estados brasileiros (Figura 9). A obtenção dessas amostras está descrita nos tópicos seguintes (5.1.1 e 5.1.2).

Para fins de análise da utilização de carga viral e mRNA E7 como biomarcadores de lesão, foram utilizadas também amostras de colo uterino e anal, previamente positivas para pelo menos um dos HR-HPV presentes na vacina nonavalente, obtidas dos seguintes projetos: (i) Incidência e fatores determinantes de lesões precursoras do câncer anal em pacientes HIV-positivos (BOLDRINI et al., 2018; VOLPINI et al., 2017), do qual foram analisadas amostras anais de homens e mulheres HIV-positivos, atendidos no CRDST/AIDS, Vitória-ES; e (ii) Lesões cervicais precursoras de câncer do colo uterino e associação com papilomavírus humano, vírus associado ao adenovírus e *Chlamydia trachomatis* em mulheres atendidas no Ambulatório de Patologia cervical do Hospital Universitário Cassiano Antonio de Moraes (HUCAM), do qual foram analisadas amostras de colo uterino de mulheres HIV-negativas (FREITAS et al., 2014) (Figura 9; Quadro 3).

Figura 9. Fluxograma referente à seleção das amostras para o estudo.



Quadro 3 – Descrição dos projetos utilizados para obtenção das amostras do estudo.

Projetos	Aprovação CEP
Prevenção de CCU em mulheres de comunidades quilombolas no Espírito Santo – Quilombolas	1.308.539/2015
Prevalência e fatores de risco para <i>C. trachomatis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i> em mulheres vivendo com HIV no Brasil – Multicêntrico	282.864/2013 e 2.4459.88/2017
Incidência e fatores determinantes de lesões precursoras do câncer anal em pacientes HIV positivos – CRDST	384.286/2013 e 1.254.427/2015
Variantes moleculares de HPV16 em diferentes graus de neoplasia intraepitelial em mulheres atendidas no Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes, Vitória-ES - HUCAM	086/09

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde - UFES, em 28 de setembro de 2018, nº 2.925.324 (ANEXO B).

5.1.1 Mulheres Quilombolas

5.1.1.1 Descrição das comunidades Quilombolas

As comunidades quilombolas são “grupos étnicos, predominantemente constituídos pela população negra rural ou urbana, que se autodefinem a partir das relações específicas com a terra, o parentesco, o território, a ancestralidade, as tradições e práticas culturais próprias”. Estima-se que cerca de 3.000 comunidades quilombolas no Brasil (BRASIL, 2017).

Em todo o Espírito Santo existem cerca de 100 comunidades quilombolas, 46 delas certificadas. No norte do estado, a região denominada Sapê do Norte, que compreende os municípios de Conceição da Barra e São Mateus, é constituída por aproximadamente 1.200 famílias. Essas comunidades são localizadas em zonas rurais, cercadas de canaviais e eucaliptais, semi-isoladas e relativamente distantes dos centros urbanos de seus municípios. As condições de vida da maioria delas são precárias, sem saneamento básico, e com acesso dificultado a serviços de saúde (Figura 10) (VICENTINI, 2013).

Figura 10 – Comunidades quilombolas de Linharinho (Conceição da Barra) e São Domingos (Conceição da Barra/São Mateus).



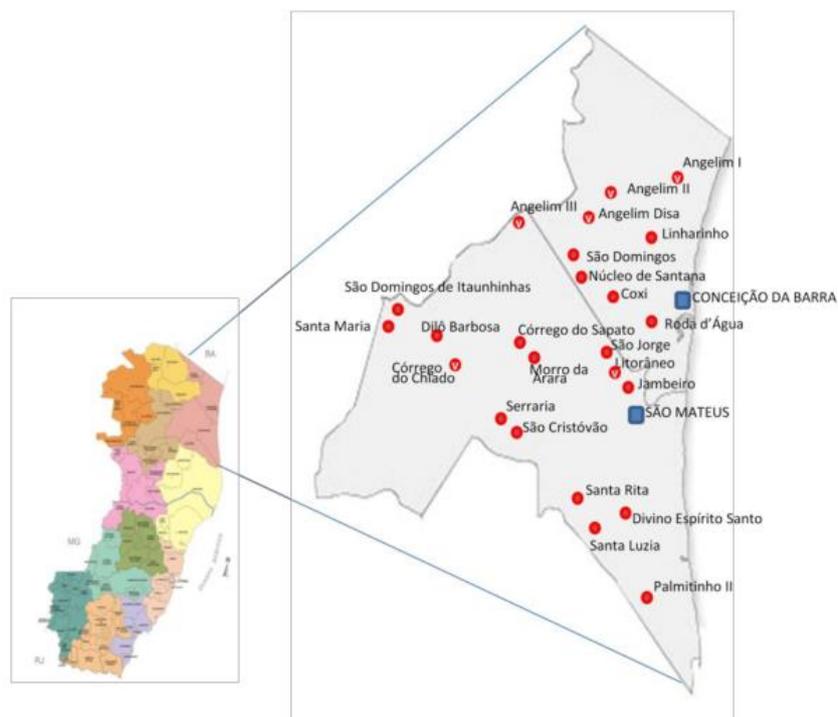
A) Imagem de satélite da Comunidade de Linharinho mostrando sua localização em meio à floresta de eucaliptos. B) Condições de moradia na comunidade São Domingos.

Fonte: Google imagens, 2018; Vicentini, 2013.

5.1.1.2 Obtenção dos espécimes clínicos

No período de março de 2016 a agosto de 2017 foram coletadas amostras de mulheres sexualmente ativas, residentes nas comunidades quilombolas dos Municípios de São Mateus e Conceição da Barra. Essas comunidades integram a chamada Região Sapê do Norte, sendo 16 em São Mateus (Angelim III, Córrego do Chiado, Córrego do Sapato, Dilô Barbosa, Divino Espírito Santo, Jambeiro, Litorâneo, Morro da Arara, Nova vista II, Palmitinho II, Santa Luzia, São Cristovão, São Domingos de Itauninhas, São Jorge, Santa Maria, Serraria, e Santa Rita) e oito em Conceição da Barra (Angelim I, Angelim II, Angelin Disa, Coxi, Linharinho, Núcleo de Santana, Roda d'água e São Domingos) (Figura 11).

Figura 11 - Mapa dos municípios de São Mateus e Conceição da Barra e as respectivas Comunidades Quilombolas.

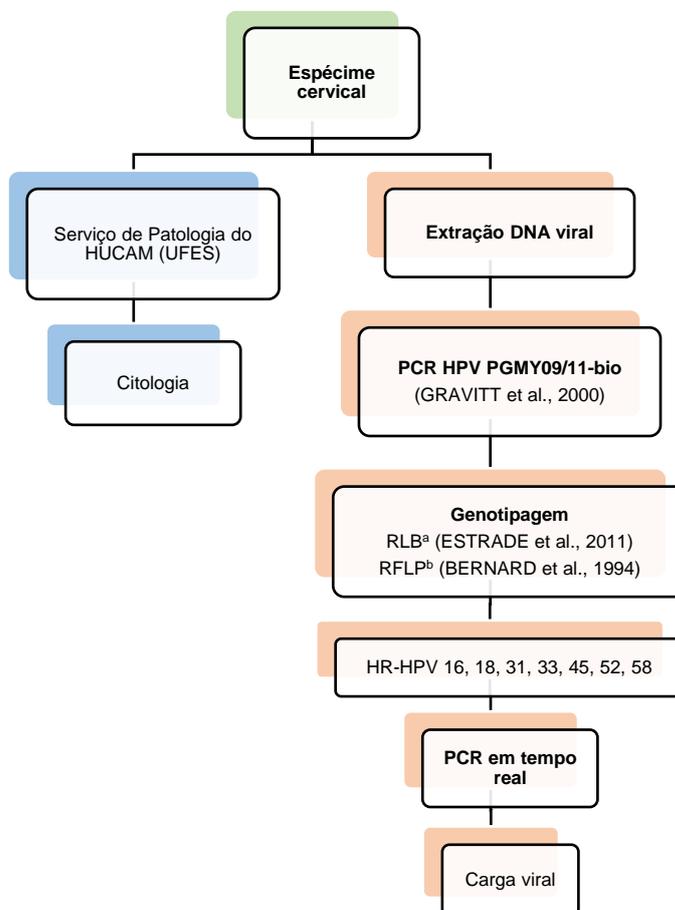


Fonte: LOZER, 2011

Escovados cervicais foram coletados, utilizando escova tipo *cytobrush*, durante exame ginecológico e acondicionados em tampão STM (*specimen transport medium*) para a pesquisa do HPV. Exame citopatológico foi realizado no Serviço de Patologia do Hospital Universitário Cassiano Antonio Moraes (HUCAM/UFES). As lâminas foram coradas pelo método de Papanicolaou, e os laudos foram liberados com base descritiva na nomenclatura brasileira para laudos citopatológicos de acordo com as normas do Ministério da Saúde. (Figura 12).

Foi realizada uma entrevista face a face, com duração de aproximadamente 20 minutos, utilizando um questionário padronizado contendo dados sócio-demográficos, epidemiológicos e clínicos (ANEXO C). As coletas dos espécimes para pesquisa foram realizadas após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde - UFES, em 4 de novembro de 2015, sendo o parecer identificado pelo número 1.308.539 (ANEXO D).

Figura 12 – Fluxograma referente aos procedimentos de coleta e processamento de espécimes cervicais de mulheres residentes em comunidades quilombolas.



^aRLB - Reverse Line Blot; ^bRFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism.

5.1.2 Mulheres soropositivas para HIV

Esta pesquisa foi realizada com amostras obtidas em estudo multicêntrico prévio intitulado “Prevalência e fatores de risco para *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* em mulheres vivendo com HIV no Brasil”, no período de março a dezembro de 2015 (MIRANDA et al., 2017).

Participaram deste estudo mulheres HIV-positivas, com idade entre 18 e 49 anos, atendidas em CR-DST/AIDS de oito estados brasileiros: Amazonas, Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (Quadro 6). Foram coletadas 647 amostras de escovado cervical, acondicionadas em meio de transporte ThinPrep® PreservCyt® (Hologic, Marlborough, MA, USA) e encaminhadas ao Laboratório São Marcos (Vila Velha – ES) para a detecção de HR-HPV por meio do método automatizado qualitativo COBAS HPV test (Roche,

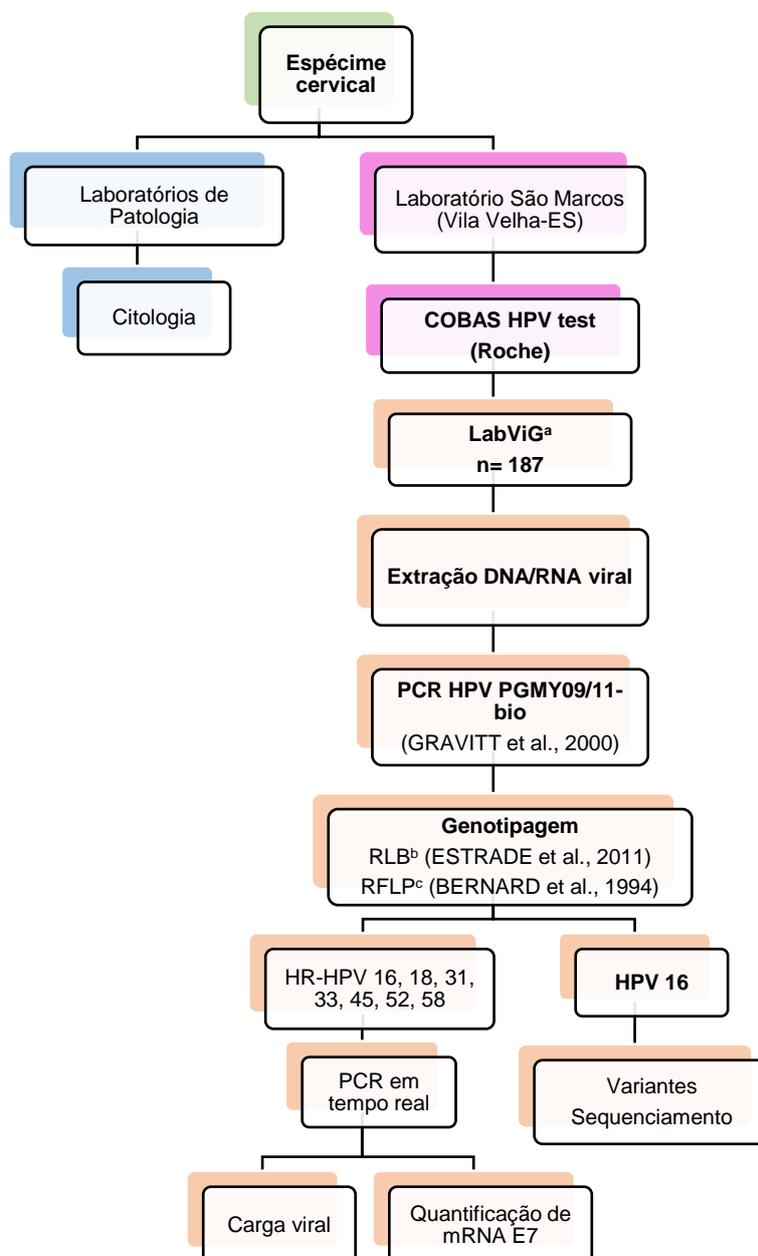
Pleasanton, CA, USA). Aprovado pelo FDA em 2011, este teste detecta 12 genótipos de HR-HPV (HPV31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68) e discrimina os genótipos 16 e 18, por meio da técnica de PCR em tempo real (HEIDEMAN et al., 2011). Para a realização da citopatologia, os espécimes foram fixados em solução de formalina tamponada a 10% e enviados aos laboratórios de patologia dos respectivos locais de coleta.

As amostras positivas para HR-HPV (n= 187) foram então remetidas ao LabViG-UFES. A partir dessas amostras foram realizadas as pesquisas adicionais referentes ao HPV. (Quadro 4; Figura 13).

Quadro 4 - Número de amostras coletadas e positivas para HR-HPV por meio do COBAS® HPV test de mulheres HIV+ atendidas em CR-DST/AIDS, no período de março a dezembro de 2015.

Região	Estado	Nº de amostras	HR-HPV positivas
Norte	Amazonas	18	9
Nordeste	Bahia	100	28
	Pernambuco	84	26
Centro-Oeste	Distrito Federal	83	27
Sudeste	Espírito Santo	123	27
	Rio de Janeiro	72	16
Sul	Paraná	67	30
	Rio Grande do Sul	100	24
Total	8	647	187

Figura 13 - Fluxograma referente ao processamento dos espécimes cervicais de mulheres HIV+.



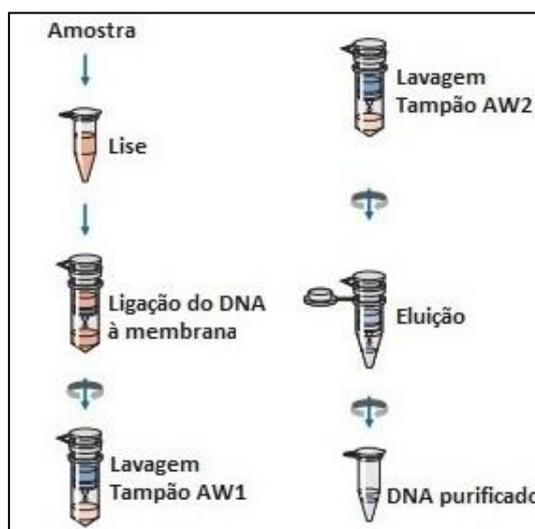
^aLabViG – Laboratório de Virologia e Gastroenterite Infecciosa; ^bRLB - *Reverse Line Blot*; ^cRFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*.

As coletas dos espécimes para pesquisa foram realizadas após assinatura do TCLE (ANEXO E) e um questionário estruturado foi aplicado para obtenção de dados sócio-demográficos, epidemiológicos e clínicos (ANEXO F). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde – UFES (CEP UFES/CCS), nº 2.445.988/2017 (ANEXO G).

5.2 EXTRAÇÃO DO ÁCIDO NUCLÉICO

A extração de ácido nucleico viral foi realizada utilizando-se o kit QIAamp DNA Mini Kit™ (Qiagen, Valencia, CA, USA) (Figura 14), conforme instruções do fabricante e brevemente descrito a seguir. Aos espécimes cervicais, foram adicionados proteinase K e tampão de lise (Tampão AL), que contém sais de guanidina, responsável pela lise celular e dissociação da nucleoproteína viral. Após incubação à 56°C, foi adicionado etanol PA. A solução foi aplicada à coluna contendo uma matriz de sílica e centrifugada. Após lavagens sucessivas da coluna com tampões (AW1 e AW2), um tampão de eluição (AE) foi adicionado e uma solução contendo o DNA purificado do material clínico foi obtida após centrifugação. O DNA extraído foi mantido a -20°C até o momento da amplificação de segmentos específicos de HPV.

Figura 14 - Representação esquemática das etapas de extração do DNA com o kit QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN), adaptado do protocolo fornecido pelo fabricante.



5.3 DETECÇÃO VIRAL

5.3.1 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Deteção de DNA do HPV foi realizada utilizando-se sete microlitros do DNA extraído e submetido à amplificação pela técnica de PCR, utilizando os dois conjuntos de *primers* PGMY09/11 (GRAVITT et al., 2000) (Quadro 5). Os *primers* PGMY11 utilizados são biotinilados na porção 5' para realização da RLB descrita no item 5.4.1. As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µL (Quadro

6). Foram consideradas positivas, as amostras que apresentaram fragmentos de 450 pb.

Quadro 5 - *Primers* consensuais PGMY09/11 utilizados na detecção por PCR e posterior tipagem de HPV por RLB.

Primers		
Marcação	Designação	Sequência (5'-3')
Biotinilados	PGMY11-A	GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG
	PGMY11-B	GCG CAG GGC CAC AAT AAT GG
	PGMY11-C	GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG
	PGMY11-D	GCC CAG GGC CAC AAC AAT GG
	PGMY11-E	GCT CAG GGT TTA AAC AAT GG
Não Biotinilados	PGMY09-F	CGT CCC AAA GGA AAC TGA TC
	PGMY09-G	CGA CCT AAA GGA AAC TGA TC
	PGMY09-H	CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC
	PGMY09-I	GCC AAG GGG AAA CTG ATC
	PGMY09-J	CGT CCC AAA GGA TAC TGA TC
	PGMY09-K	CGT CCA AGG GGA TAC TGA TC
	PGMY09-L	CGA CCT AAA GGG AAT TGA TC
	PGMY09-M	CGA CCT AGT GGA AAT TGA TC
	PGMY09-N	CGA CCA AGG GGA TAT TGA TC
	PGMY09-P	GCC CAA CGG AAA CTG ATC
	PGMY09-Q	CGA CCC AAG GGA AAC TGG TC
	PGMY09-R	CGT CCT AAA GGA AAC TGG TC
	HMB01	GCG ACC CAA TGC AAA TTG GT

Fonte: WHO, 2010.

As amostras negativas para DNA de HPV foram submetidas à amplificação do gene *β-globina*, realizada como controle de extração e de integridade do DNA, obtido com *primers* específicos *sense* (5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3') e *anti-sense* (5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'), que geram um fragmento de 270 pb (HUANG et al., 1989). A reação de amplificação foi realizada com cinco microlitros do DNA extraído adicionados a 20 µL da mistura de reação para PCR, conforme concentrações e programa de amplificação descrito nos Quadros 6 e 7.

Os produtos de amplificação foram resolvidos em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio (EtBr) 0,5 µg/mL e visualizados sob luz ultravioleta em sistema de documentação de géis MiniBIS® Pro (BioAmerica, Miami, FL, USA).

Paralelamente à extração do espécime, foi realizada a extração de água livre de DNase e RNase como controle negativo de reação de amplificação. O preparo da mistura de reações e a aplicação das amostras foram realizados em salas distintas, minimizando a possibilidade de contaminação. Todas as reações de amplificação foram realizadas no termociclador Veriti® Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Quadro 6 - Mistura para PCR para o gene β -globina e HPV.

Reagentes da mistura para PCR	Concentração / volume (25 μ L reação)	
	β -globina	HPV
dNTP ^a	0,2 mM	0,2 mM
Tampão de reação (10X)	5 μ L	5 μ L
MgCl ₂ 50mM:	1,5 mM	1,5 mM
Primers: sense	0,32 μ M	40 pmol
Antisense	0,32 μ M	40 pmol
Taq polimerase	0,05 uds	0,1 uds
DNA (amostra)	5 μ L	7 μ L

^aDesoxirribonucleotídeos fosfatados

Quadro 7 - Programas de amplificação utilizados para gene β -globina e HPV.

Fase do programa		β -globina		HPV	
		Tempo	°C	Tempo	°C
Desnaturação inicial		2 min	94	5 min	94
45 ciclos	Desnaturação	20 s	94	1 min	94
	Anelamento	30 s	50	1 min	55
	Extensão	30 s	72	1 min	72
Extensão final		10 min	72	10 min	72

5.4 DETERMINAÇÃO DO GENÓTIPO

O genótipo viral foi inicialmente determinado nos espécimes positivos pela técnica de RLB. A técnica de RFLP foi realizada quando o genótipo não foi evidenciado pela primeira técnica.

5.4.1 *Reverse Line Blot (RLB)*

Produtos de PCR obtidos com PGMY09/11 biotinilados foram hibridizados com sondas ligadas covalentemente a uma membrana de *nylon* Biodyne™ carregada negativamente (Pall Corporation, New York, NY, USA) (Quadro 8), seguindo as etapas descritas a seguir. Foram diluídos 10 µL do produto biotinilado com 150 µL do tampão 2x SSPE - 0,1% SDS (duodecil sulfato de sódio) (p/v) e incubados a 96°C por 10 min. para desnaturação do DNA, sendo posteriormente resfriados em gelo por 10 min. A membrana contendo as sondas para 32 genótipos de HPV foi lavada com 150 mL de 2x SSPE (Salina-fosfato-EDTA) – 0,1% SDS por cinco minutos à temperatura ambiente e colocada no *blotter* (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Foram aplicados 140 µL do produto diluído no *blotter*, com a membrana posicionada de forma que as sondas ficassem localizadas transversalmente, e incubado em forno de hibridização a 51°C por 60 min. As amostras foram então aspiradas, a membrana foi lavada por 20 min com tampão 2x SSPE - 0,5% SDS a 51°C e incubada com conjugado (estreptavidina-peroxidase 1: 4000) em tampão 2x SSPE – 0,5% SDS em garrafa de rotação por 60 min a 42°C. Após lavagem com 150 mL de tampão 2x SSPE - 0,5% SDS por 20 min a 42°C com agitação e com tampão 2x SSPE por 10 min. à temperatura ambiente, 5 mL de Reagentes de Detecção 1 e 2 (Amersham ECL, GE Healthcare) foram adicionados à membrana que, após incubação por um minuto, foi colocada entre duas folhas de acetato transparente dentro de um cassete radiográfico. Uma película radiográfica foi disposta sobre o acetato, para exposição durante 30 min. A película foi revelada com reagentes radiográficos (Kodak, Rochester, NY, USA), procedendo-se à análise dos resultados.

Quadro 8 - Sondas para Hibridização Reversa em Linhas.

Genótiposde HPV	Sequências (5'-3')
HPV06_RHP	TGG AAG ATG TAG TTA CGG ATG
HPV11_RHP	GCA GAT TTA GAC ACA GAT GCA
HPV16_RHP	GAT ATG GCA GCA CAT AAT GAC
HPV18_RHP	CCA GGT ACA GGA GAC TGT GTA
HPV26_RHP	TAC GCT GAC AGG TAG TAG CAG
HPV31_RHP	AGT ATC ACT GTT TCG AAT TGC
HPV33_RHP	TGT CAC TAG TTA CTT GTG TGC
HPV34_RHP	GCA GTT GTA CTT GTG GAT TGT
HPV35_RHP	AGA AGA CAC AGC AGA ACA CAC
HPV39_RHP	GTA GAA GGT ATG GAA GAC TCT
HPV40_RHP	ATA GCC TTG TTG GTA AGG AAC
HPV42_RHP	TGT ATC ACC AGA TGT TGC AGT
HPV43_RHP	ACA GTA GGG TCA GTA GAG GCA
HPV44_RHP	TAG TAT ATG TAG ACG GAG GGG
HPV45_RHP	GTA CTT GGC ACA GGA TTT TGT
HPV51_RHP	TTA CTT GGA GTA AAT GTT GGG
HPV52_RHP	CTT TCC TTT AGG TGG TGT GTT
HPV53_RHP	AGA CAT AGA CTG TGT GGT TGC
HPV54_RHP	TTA TTA AAG CTA TCC TGC GTG
HPV55_RHP	GAT GGA GAC TGA GTT GTA GCA
HPV56_RHP	TTT CGT GCA TCA TAT TTA CTT
HPV57a_RHP	TAC AGT GGC ACA CAA AGA GAC
HPV57b_RHP	TTC TGT GTT TAC AGT GGC ACA
HPV58_RHP	CTT CCT TAG TTA CTT CAG TGC
HPV59a_RHP	AGT AGA GCA CAC ACA GAA AGA
HPV59b_RHP	AGT AGA AGC ACA CAC AGA AAG
HPV66_RHP	AGT TAA TGT GCT TTT AGC TGC
HPV68_RHP	CTGATTGCAGATAGCGGTATG
HPV69_RHP	GTT TAA AAG TGG CAG ATG CAG
HPV70_RHP	CTA TAT ACA GCA GGT ATG GCC
HPV 73_RHP	GGC ATA CGT TGT AGT AGA GCT
HPV 82_RHP	TGC AAC AGA TTG AGT AAC AGC
HPV 83_RHP	AGA GGC TGT GTA TTC ATT AGC
HPV 84_RHP	ATT CTG ATT CGG TGT TGG TAG

Fonte: WHO, 2010.

5.4.2 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

O método de RFLP, que permite a detecção de 44 genótipos de HPV, foi realizado conforme descrito por Bernard et al. (1994) com as modificações a seguir: 1 ng de produto de PCR obtido com os *primers* PGMY09/11 foi digerido com 10 unidades de cada enzima de restrição *Bam*HI, *Dde*I, *Hae*III, *Hin*fI, *Pst*I, *Rsa*I e *Sau*3AI (Promega®, Madison WI) em tampão de digestão (1 M NaCl; 100 mM MgCl₂; 100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM β-mercaptoetanol) e incubado a 37°C por 12 horas. Os produtos de digestão enzimática foram visualizados sob luz UV após eletroforese em gel de agarose a 3,0%, corados com EtBr 0,5 µg/mL e analisados comparando-se com a tabela de referência conforme tamanho de fragmentos esperados para cada tipo (BERNARD *et al.*, 1994) (ANEXO A).

5.5 DETERMINAÇÃO DAS VARIANTES DE HPV16

Todas as amostras positivas para HPV16 pelo COBAS foram submetidas a uma reação de PCR com *primers* para a região *LCR* do HPV16 (Quadro 9), que amplifica um fragmento comum às variantes. Para identificar as alterações nucleotídicas específicas de cada variante, foi realizada a técnica de sequenciamento de Sanger, conforme descrito a seguir.

Os produtos de amplificação foram resolvidos em gel de agarose e, em caso de banda única, um µl da preparação enzimática ExoProStar™ (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) foi adicionado a cinco µl de produto da PCR, com a incubação a 37°C por 15 min., seguida de incubação a 80°C por 15 min. O produto purificado foi mantido a -20°C até sua utilização na reação de sequenciamento. Em casos de fragmentos inespecíficos na PCR, o produto foi purificado diretamente do gel utilizando o PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), conforme instruções do fabricante e brevemente descrito a seguir. O fragmento de interesse foi recortado, solubilizado com tampão de digestão (*Buffer* L3) e incubado por 10 min a 50°C. Esta solução foi aplicada a uma coluna contendo uma membrana de sílica e centrifugada. Após a adição do tampão de lavagem (W1) e centrifugação, o conteúdo da coluna foi eluído utilizando o tampão de eluição (E5). O produto da PCR purificado foi mantido a -20°C até sua utilização na reação de sequenciamento.

A reação de sequenciamento foi realizada com o kit Big Dye Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), conforme instruções do fabricante. O produto desta reação foi precipitado com etanol-EDTA, eluido em Formamida Hi-Di™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e submetido à eletroforese capilar no equipamento ABI 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Quadro 9 - *Primers* para a região LCR do HPV16

Primers	Sequência de bases
<i>Sense</i>	5'-GCC AAC CAT TCC ATT GTT TT-3'
<i>Anti-sense</i>	5'-GAT TTC GGT TAC RCC CTT AG-3'

Fonte: CHEN; FREITAS; BURK, 2015.

As sequências obtidas foram editadas utilizando-se o software Bioedit software v7.2.5 (HALL, 1999) e, então, alinhadas com as sequências-referência de HPV16 para cada sublinhagem (BURK; HARARI, CHEN et al., 2013) (Quadro 10), utilizando o programa SeaView v4.5.4 (GOUY; GUINDON; GASCUEL, 2010). A construção da árvore filogenética de todas as sequências alinhadas, pelo método de *Neighbor-joining*, foi realizada pelo software MEGA v6.0 (TAMURA et al., 2013).

Quadro 10 - Sequências usadas como referência para alinhamento e análise filogenética de HPV16.

Linhagem	Sublinhagem	Variante	Nº acesso GenBank	Outras denominações
A	A1	Ref	K02718	Europeia (E)
	A2	w0122	AF536179	E
	A3	AS411	HQ644236	E
	A4	W0724	AF534061	E
B	B1	W0236	AF536180	Africana 1 (Afr1a)
	B2	Z109	HQ644298	Africana 1 (Afr1b)
C		R460	AF472509	Africana 2 (Afr2a)
D	D1	QV00512	HQ644257	Norte Americana (NA)1
	D2	QV15321	AY686579	Asiática-americana (AA)2
	D3	QV00995	AF402678	Asiática-americana (AA)1

Fonte: BURK; HARARI, CHEN et al., 2013, adaptado.

5.6 DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL DOS HR-HPV

Amostras positivas para os HR-HPV 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58 foram submetidas à PCR em tempo real para quantificação do DNA viral (qPCR). Foram utilizados *primers* e sondas de hidrólise específicos para as regiões *E6* e *E7* do HPV16 e HPV18, respectivamente (GRAVITT et al., 2003), e para a região *E7* dos genótipos 31, 33, 45, 52 e 58 (WINER et al., 2014) (Quadro 11). A reação de qPCR dos HPV16 e 18 foi realizada por método *in house*, com três µL do DNA extraído adicionados a sete µL da mistura de reação para PCR, conforme concentrações e programa de amplificação descritos nos Quadros 12 e 13. Para os demais genótipos, três µL do DNA extraído foram adicionados a sete µL de mistura de reação contendo 1x PCR Master Mix TaqMan® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 300 nM de cada *primer* e 100 nM da sonda de hidrólise.

Paralelamente, foi realizada qPCR para o gene *β-globina* (WEISSENBORN et al., 2010) para avaliar a qualidade e a quantidade do DNA extraído. Três microlitros do DNA extraído foram adicionados a sete µL de mistura de reação contendo 1x PCR Master Mix TaqMan® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 300 nM de cada *primer* e 100 nM da sonda de hidrólise. O programa de amplificação encontra-se descrito no Quadro 13.

Cada amostra foi amplificada em duplicata e todas as reações foram realizadas em placas ópticas de 96 poços MicroAmp® e em equipamento StepOnePlus™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

As quantificações absolutas foram alcançadas comparando o Ct (*Cycle Threshold*) das amostras clínicas com o Ct de diluições seriadas das sequências específicas sintetizadas para cada tipo de HPV pesquisado e para o gene *β-globina*, obtendo-se uma curva padrão (Item 5.6.1). Carga viral do HPV foi expressa como nº de cópias/célula obtida pelo cálculo da quantidade de DNA de HPV amplificado dividida pela metade da quantidade de DNA de *β-globina* amplificada em cada amostra (cada célula somática humana contém duas cópias do gene da *β-globina*), conforme a seguinte equação:

$$\text{cópias de DNA de HPV} / \frac{\text{cópias de DNA de } \beta\text{-globina}}{2}$$

Quadro 11 - *Primers* e sondas utilizados na reação de qPCR.

Primer / sonda	Sequência 5'-3'
E6-HPV16.F	ATG ACT TTG CTT TTC GGG AT
E6-HPV16.R	CTT TGC TTT TCT TCA GGA CA
E6-HPV16.sonda	FAM - ACG GTT TGT TGT ATT GCT GTT CTA A- BHQ1
E7-HPV18.F	ATG TCA CGA GCA ATT AAG C
E7-HPV18.R	TTC TGG CTT CAC ACT TAC AAC A
E7-HPV18.sonda	FAM - CGG GCT GGT AAA TGT TGA TG- BHQ1
E7-HPV31.F	CGA CAG CTC AGA TGA GGA GGA T
E7-HPV31.R	GGA TGT GTC CGG TTC TGC TT
E7-HPV31.sonda	FAM – TCA TAG ACA GTC CAG CTG G- BHQ1
E7-HPV33.F	TGA CAG CTC AGA TGA GGA TGA AG
E7-HPV33.R	CTG TGG CTG GTT GTG CTT GT
E7-HPV33.sonda	FAM – CTT GGA CCG GCC AGA T - BHQ1
E7-HPV45.F	GCG AGT CAG AGG AGG AAA ACG
E7-HPV45.R	CGG GCT GGT AGT TGT GCA T
E7-HPV45.sonda	FAM – TGA AGC AGA TGG AGT TAG T- BHQ1
E7-HPV52.F	GAC AGC TCA GAT GAG GAG GAT ACA
E7-HPV52.R	TGG CTT GTT CTG CTT GTC CAT
E7-HPV52.sonda	FAM – ATG GTG TGG ACC GGC – BHQ1
E7-HPV58.F	GAC AGC TCA GAC GAG GAT GAA A
E7-HPV58.R	TGG CCG GTT GTG CTT GT
E7-HPV58.sonda	FAM – AGG CTT GGA CGG GC – BHQ1
β -globina.F	GCT TCT GAC ACA ACT GTG TTC AC
β -globina.R	GGC CTC ACC ACC AAC TTC AT
β -globina.sonda	FAM - CAC GTT CAC CTT GCC CCA CAG G – BHQ1

Quadro 12 - Concentração dos reagentes utilizados para amplificação dos HPV16 e 18.

Reagentes	Concentração/ volume (10µL reação)	Volume (1x) MI
H ₂ O destilada	-	3,66
Buffer (10x)	1x	1,00
dNTP (200 mM)	20 mM	1,00
MgCl ₂ (50 mM)	4 mM	0,80
Primer forward (20 µM)	0,2 µM	0,10
Primer reverse (20 µM)	0,2 µM	0,10
Sonda (10 µM)	0,1 µM	0,10
Taq Platinum (5U)	1 U	0,20
CXR* (30 µM)	0,12 µM	0,04
DNA	10 ng/uL	3,00

Quadro 13 - Programas de amplificação de HPV e β -globina.

Ciclos	β -globina		HPV 16 e 18		HPV 31, 33, 45, 52 e 58	
	Tempo	°C	Tempo	°C	Tempo	°C
1x	2 min	50	2 min	50	2 min	50
	10 min	95	10 min	95	10 min	95
45x	15 s	95	15 s	95	10 s	95
	1 min	60	30 s	55	1 min	60

5.6.1 Padronização e preparo das curvas-padrão

Padrões de DNA foram preparados a partir de fragmentos sintéticos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) de DNAdf, desenhados a partir de sequências referência dos genótipos de HPV pesquisados e do gene β -globina, abrangendo a região entre os *primers*.

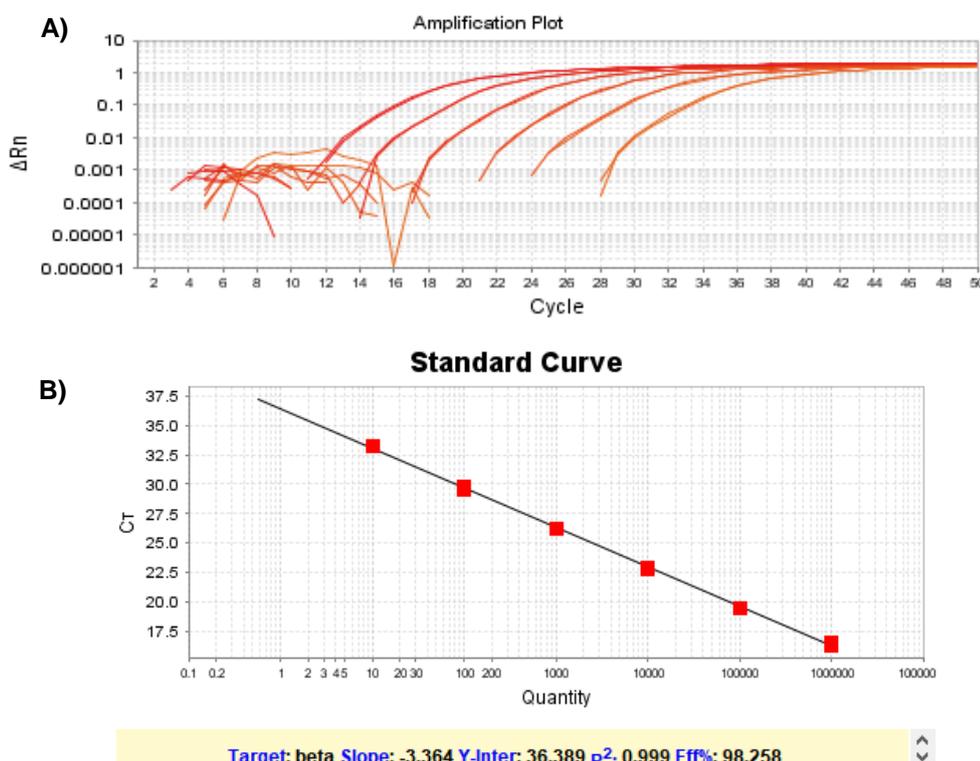
Os cálculos para obtenção do número de cópias de DNA do HPV e de β -globina foram realizados a partir da concentração do fragmento produzido (em ng), utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{nº de cópias/}\mu\text{L} = \frac{\text{g/}\mu\text{L de DNA}}{\text{Tamanho do fragmento em pb} \times 660} \times 6,022 \times 10^{23}$$

Onde $6,022 \times 10^{23}$ corresponde ao número de Avogrado e o valor de 660 é obtido pelo peso médio dos nucleotídeos (330 Daltons) multiplicado por 2, por se tratar de fita dupla de DNA (WHELAN et al., 2003). Foi realizada uma diluição seriada (1:10) do fragmento de DNA obtido, em água livre de DNase e RNase, de modo a se obter concentração inicial de 10^6 e final de 10^1 cópias de DNA.

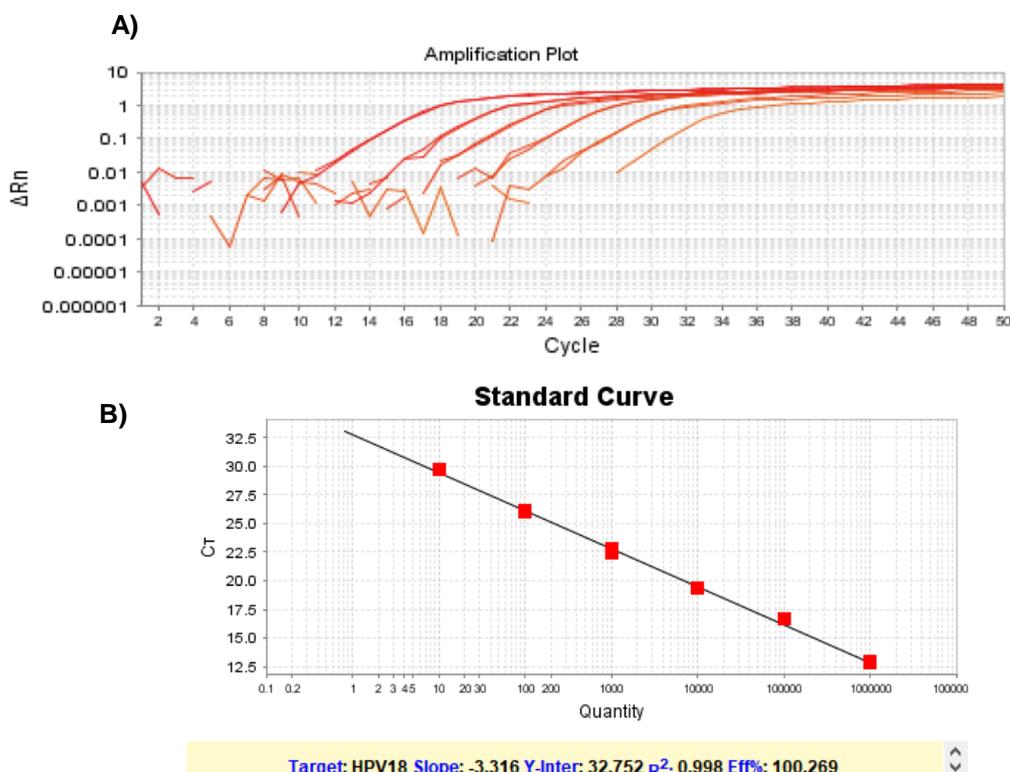
Curvas-padrão foram contruídas utilizando fragmentos sintéticos de: (i) DNAdf de cada HR-HPV pesquisado (HPV16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58), simulando a carga viral com 6 pontos na curva (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 e 10^1 cópias de DNA); (ii) DNAdf do gene da β -globina humana também com 6 pontos na curva (10^6 - 10^1 cópias de DNA) para estimar a carga viral do HPV em cópias por célula. Nas Figuras 15 e 16, encontram-se exemplificadas as curvas-padrão do gene β -globina e do HPV18.

Figura 15 - Gráfico da amplificação da curva-padrão do gene β -globina por qPCR.



A) Curva-padrão do gene β -globina utilizando fragmentos sintéticos de DNAdf com concentrações de 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 e 10^1 cópias de DNA. B) Parâmetros da curva-padrão do gene β -globina.

Figura 16 – Gráficos da amplificação da curva-padrão do HPV18 por qPCR.

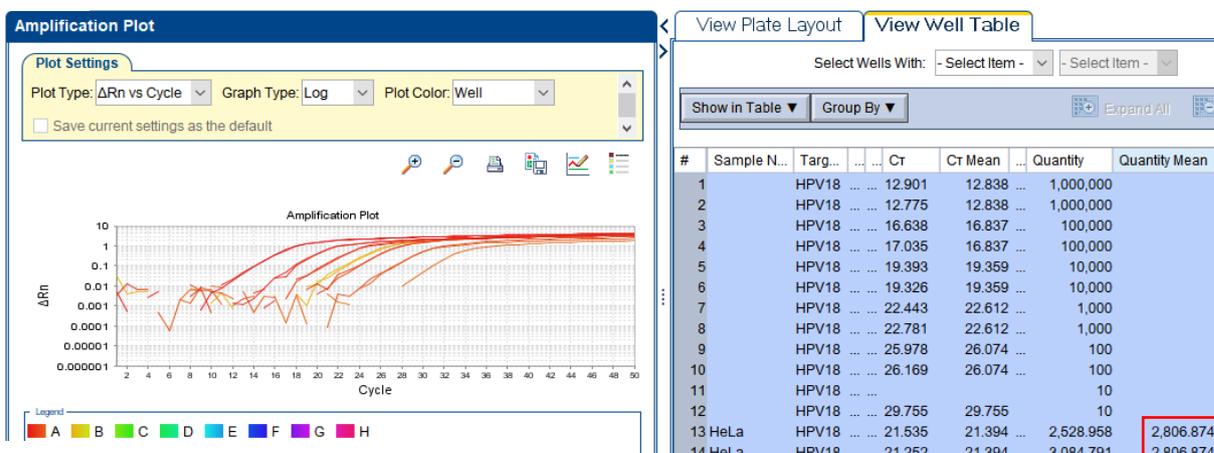


A) Curva-padrão do HPV18 utilizando fragmentos sintéticos de DNA de com concentrações de 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 e 10^1 cópias de DNA. B) Parâmetros da curva-padrão do HPV18.

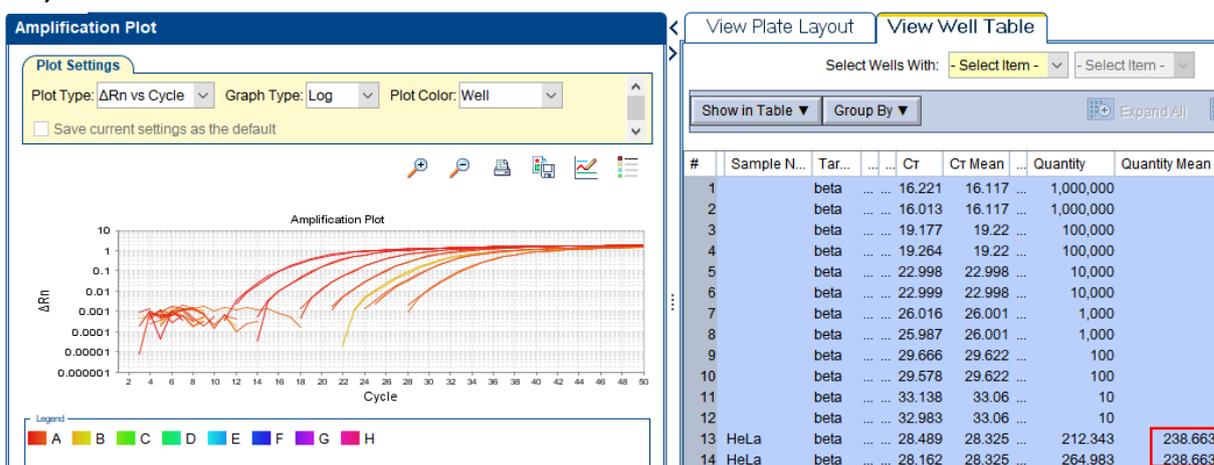
Como controle de precisão e reprodutibilidade em estimar a carga viral, foram utilizados DNA extraído das linhagens celulares CaSki (ATCC® CRL-1550™), gentilmente fornecidas pela Dra Luisa Villa (coordenadora do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia das Doenças Associadas ao Papilomavírus - INCT-HPVSP), e HeLa (ATCC® CCL-2™). A célula CaSki consiste em uma linhagem celular de carcinoma epidermóide com DNA do HPV16 em quantidade de 400-600 cópias e a HeLa é uma linhagem celular de adenocarcinoma cervical contendo 20-50 cópias de DNA do HPV18 integrado (Figura 17).

Figura 17 - Gráfico da amplificação das curvas-padrão do HPV18 e do gene β -globina por qPCR.

A)



B)



A) Quantificação no número de cópias de DNA de HPV18 presentes na linhagem celular HeLa. B) Quantificação do número de cópias do gene β -globina na linhagem celular HeLa, para estimar o número de células presentes.

Na figura 17, encontram-se representados o número de cópias de HPV18 (A) e do gene β -globina (B) presentes na linhagem celular HeLa. O resultado de cópias por célula é alcançado dividindo-se o valor da quantificação do DNA de HPV 18 (2.806,874) pela metade do valor da quantificação da β -globina (238,663/2). Neste caso, a carga viral de HPV18 na célula HeLa foi de 23,5 cópias/célula, dentro do esperado para esta linhagem celular (20-50 cópias).

O ensaio foi considerado adequado quando os parâmetros da curva-padrão alcançaram: (i) *slope* de 3,32 ciclos de distância (tolerância de $\pm 10\%$ de variação), (ii) R^2 próximo de 1 e (iii) Eficiência (%) próximo de 100% (tolerância de 90–110%).

A carga viral do HPV foi classificada como baixa (≤ 10 cópias/célula), moderada (11-100 cópias/célula), alta (101-1.000 cópias/célula) e muito alta (> 1.000 cópias/célula), conforme previamente estabelecido (SCHLECHT et al., 2003).

5.7 QUANTIFICAÇÃO DE TRANSCRITOS DO ONCOGENE *E7*

Para a determinação da quantidade de transcritos do oncogene *E7* (mRNA *E7*) adaptamos o ensaio de carga viral para detectar apenas RNA adicionando uma etapa de digestão com DNase e uma etapa de transcrição reversa. *E6* e *E7* são transcritos a partir do mesmo promotor como um único pré-RNA *E6/E7* bicistrônico (ZHENG e BAKER 2006). A ORF *E6* neste pré-mRNA bicistrônico contém um íntron que está sujeito a *splicing* alternativo. Nós verificamos, então, se os *primers* e sondas utilizados para cada genótipo de HPV no ensaio de carga viral possuíam uma região intrônica. Com exceção dos *primers* e sondas utilizados para HPV16, todos os demais tinham como alvo uma região do gene *E7*, que não sofre *splicing*. Para o HPV16, neste ensaio, foram utilizados *primers* e sondas conforme descrito por Winer e colaboradores (2014).

Brevemente, para detecção e quantificação do mRNA *E7*, RNA total amostras positivas para os HR-HPVs 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58 foi extraído utilizando o kit PureLink® Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen Carlsbad, CA, EUA) para posterior realização da qPCR. A concentração de RNA total extraído foi determinada utilizando Qubit 4 Fluorometer® (Invitrogen Carlsbad, CA, EUA). Para eliminar o DNA da amostra, o RNA total extraído foi submetido à tratamento com DNase livre de RNase utilizando o kit DNase Max Kit® (Qiagen), de acordo com instruções do fabricante. Posteriormente, cinco μL do RNA tratado foram desnaturados com um μL de dimetil-sulfóxido (DMSO – Sigma) à 97°C por 7 min e refrigerado a 4°C. Procedeu-se a síntese do DNA complementar (cDNA) em volume final de 25 μL contendo 60 unidades de transcriptase reversa Superscript II™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 20 mM de *primer* randômico *Random Hexamers primer* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 3 mM de MgCl_2 , 200 μM de cada dNTP e tampão de reação (20 mM de tris-HCl pH 8,4, 50 mM de KCl). A mistura foi incubada a 44°C por 60 min seguida de 95°C por 10 min.

A reação de qPCR para cada genótipo de HPV foi realizada com três μL do cDNA adicionados a sete μL da mistura de reação para PCR, utilizando *primers*, sondas e condições de reação conforme descrito no item 5.6. A curva-padrão para cada genótipo de HPV foi construída usando fragmentos sintéticos conforme descrito no item 5.6.1.

A reação de detecção do gene humano *GAPDH* (VANDESOMPELE et al., 2002) foi realizada como controle da suficiência da amostra. Além disso, foi realizada qPCR nas amostras tratadas com DNase, sem a etapa de transcriptase reversa, para verificar se não havia DNA remanescente. A detecção do cDNA foi aceita apenas se não houvesse detecção na amostra correspondente tratada com DNase ou se houvesse detecção com um valor de Ct superior a 10 ciclos acima do valor de Ct para o cDNA (ANDERSSON et al. 2012). A quantidade de transcrito foi expressa como cópias de mRNA E7 por ng de RNA total.

5.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as informações foram codificadas e armazenadas anonimamente em um banco de dados criado para este fim. Foi utilizado o programa estatístico *SPSS–data entry 20.0. (Statistical Pacckage for the Social Sciences)*. As possíveis associações entre as variáveis foram testadas por meio de testes de qui-quadrado, com correção Fisher, quando apropriado. Para as variáveis contínuas, Teste de *Mann–Whitney* foi utilizado na comparação de dois grupos e *Kruskal Wallis* na comparação de três ou mais grupos. A relação entre a carga viral e as medições de mRNA foi avaliada com o coeficiente de correlação de *Pearson*. Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significante.

6. RESULTADOS

Os resultados obtidos encontram-se descritos nos seguintes manuscritos, sendo um publicado na *BMC Infectious Diseases* e dois a serem submetidos posteriormente.

6.1 MANUSCRITO PUBLICADO

O manuscrito a seguir foi publicado na *BMC Infectious Diseases* e possui os resultados referentes à pesquisa do HPV em mulheres quilombolas.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Viral load and high prevalence of HR-HPV52 and 58 types in black women from rural communities



Lays Paula Bondi Volpini^{1*}, Jerusa Araújo Dias², Luciana Bueno de Freitas³, Maria Carmen Lopes Ferreira Silva⁴, Angélica Espinosa Miranda^{1,5} and Liliana Cruz Spano^{1,4}

Abstract

Background: The high-risk human papillomavirus (HR-HPV) infection is the main cause of cervical cancer development, and the most common types were included in the last approved nonavalent vaccine (9vHPV). Geographical, socioeconomic and ethnic barriers in developing countries challenge primary and secondary prevention measures of cervical cancer. We aimed to determine the prevalence of HPV infection and the viral load of HR-HPV 9vHPV-related types black women resident in rural semi-isolated communities.

Methods: A descriptive study was conducted with 273 cervical samples of women from rural communities of Southeastern Brazil. Viral DNA was amplified by PCR, the genotype was identified by Reverse Line Blot (RLB) and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), and real-time PCR was applied to determine the viral load.

Results: HPV frequency was 11.4% (31/273), associated with the presence of cytological abnormalities (32.3%; $p < 0.001$). Thirty-one distinct genotypes were detected; HR-HPV occurred in 64.5% (20/31) of the samples and the most prevalent type were HPV52 > 58, 59. Multiple infections occurred with up to nine different genotypes. The viral load of HR-HPV 9vHPV-related types was higher in lesions than in normal cytology cases ($p = 0.04$); “high” and “very high” viral load occurred in HSIL and LSIL, respectively ($p = 0.04$).

Conclusions: We highlight that despite the low HPV frequency in the black rural women population, the frequency of HR-HPV was high, particularly by the HR-HPV52 and 58 types. Moreover, the HR-HPV viral load increased according to the progression from normal to lesion, being a potential biomarker to identify those women at higher risk of developing cervical lesions in this population.

Keywords: HPV, Viral load, Rural communities, Cervical cancer screening

Background

Human papillomavirus (HPV) is the most common sexually transmitted infection (STI), and the main cause of cervical cancer development [1]. According to the risk of oncogenic progression, HPV with tropism for the anogenital site are classified as low-risk (LR-HPV), high-

risk (HR-HPV), probable carcinogenic and undetermined-risk (UR-HPV) [2]. Among HR-HPV strains, the HR-HPV16 and 18 are responsible for the most cases of cervical cancer, followed by types 31, 33, 45, 52 and 58 [3].

Cervical cancer is the third most common cancer among women worldwide, with an estimated 569,847 new cases, and 311,365 deaths in 2018 [4]. More than 84% of cases and deaths due to cervical cancer occur in women from low-resource regions of the World [5].

* Correspondence: layspaula90@gmail.com

¹Infectious Diseases Post-Graduate Program, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Control measures are based on the primary prevention with the bivalent HPV (16/18), tetravalent HPV (4vHPV-6/11/16/18), and nonavalent (9vHPV-6/11/16/18/31/33/45/52/58) vaccines, and on the secondary prevention by Pap test screening for precursor lesions, which reduced the cervical cancer in developed countries with organized screening programs [6]. Additional secondary tests based on the detection of HPV DNA have been introduced in the cervical cancer screening associated with cytology (co-test) or as primary screening in some developed countries [7]. Although Brazil has adopted Pap test as control measure for decades, besides 4vHPV since 2014, cervical cancer remains the third most common cancer in women, with approximately 16,370 new cases in 2018, corresponding to 41% of all cervical cancers cases in South America [4, 8].

Geographic, socioeconomic and ethnic barriers contribute to inequalities in the access to healthcare, as observed in black women, with a low socioeconomic status [9]. In this context are the Brazilian black women who live in rural African slave remnant communities, which health data are limited, especially regarding HPV prevalence and risk factors associated with cervical cancer [10, 11].

Additional strategies for cervical cancer prevention are imperative. Despite the low specificity, the HPV test has high sensitivity, allowing larger screening intervals and playing a promising role in cervical cancer prevention [12]. The association with potential biomarkers of high-grade cervical lesion (HSIL) and cancer, such as HPV viral load, could improve the specificity and will have potential benefit in reducing the incidence of cancer [13].

In this study, we aimed to determine the prevalence of HPV infection and the viral load of the HR-HPV genotypes correspondent to the types of the 9vHPV (9vHPV-related) in black women resident in rural semi-isolated communities.

Methods

Patients, samples, sociodemographic data and ethic aspect

This is a descriptive study conducted between March 2016 to August 2017 in sexually active women from 16 semi-isolated communities located at Espírito Santo State, Southeastern Brazil. These communities are connected by unpaved roads of difficult access, between 6.21 mi (10 km) and 18.64 mi (30 km) from urban centers and from each other.

Women from 15 to 79 years, sexually active, were included in this study. They answered a questionnaire about sociodemographic and behavioral data. Cervical samples were collected using a cytobrush, transported in Digene Specimen Transport Medium (STM, Qiagen

Incorporated, Valencia, CA), and maintained at -70°C for HPV investigation. Papanicolaou method was applied for the cytological evaluation at the Pathology Laboratory of the University Hospital of the Espírito Santo state by a single pathologist with expertise, and cervical abnormalities were interpreted according to the criteria defined in the Bethesda system [14].

This research obtained approval by the Ethical Research Council of the Center of Health Sciences of the Federal University of Espírito Santo, Brazil (Protocols n. 1.308.539 and 2.925.384). All participants signed an informed consent agreement. All the minors enrolled in this study and their parents/guardians signed the agreement consent (Resolution 466/12 of the National Health Council and its complementary) after the explanation of the study objectives.

HPV detection and genotyping

DNA was obtained using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions, and the HPV DNA was detected by amplification with the PGM09/11 set of primers [15]. PCR for the β -globin gene was performed in HPV negative samples as an extraction control and to assess the DNA integrity [16]. All the HPV positive samples were genotyped using a Reverse Line Blot (RLB) assay and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), as previously described [17, 18].

HPV genotypes identified in this study were classified as HR-HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59), LR-HPV (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 and 89) and UR-HPV (2a, 3, 7, 10, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 55, 57, 62, 67, 69, 71, 74, 77, 83, 84, 85, 86, 87, 90 and 91) [2]. Genotypes considered probable carcinogenic (26, 53, 66, 68, 73 and 82) were grouped with HR-HPV.

Quantitative real-time PCR analysis for HPV DNA viral loads

The viral load of HR-HPV 9vHPV-related types (16, 18, 31, 33, 45, 52 and 58) was determined by quantitative real-time PCR (qPCR). Primers and probes for *E6* and *E7* genes were used for HPV16 and HPV18, respectively, and *E7* for HPV31, 33, 45, 52 and 58 [19, 20].

The assay for HPV16 and 18 was performed according to Gravitt et al. (2003) [19] with modifications. In brief, 2 μL of extracted DNA were added to 8 μL of master mix containing 1X Buffer (200 mM Tris HCl and 500 mM KCl), 20 mM of each dATP, dGTP, dCTP and dTTP, 0.1 μM of hydrolysis probe, 0.2 μM of each primer, 0.6 mM of MgCl_2 , 0.12 μM of CXR Reference Dye (Promega Madison, WI, USA), and 1 Unit of Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen Carlsbad, CA, USA). Thermal cycler conditions were previously described [19]. The assay for HPV 31, 33, 45, 52, and 58 was performed using 1x

TaqMan® PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), as previously described [20].

The viral load was normalized using qPCR for the β -globin gene with primers described by Huang et al. (1989) [16]. The hydrolysis probe was designed to target the region between the primers using Primer3 v.0.4.0 [21]. The reaction condition proceeded as above described. All amplification assays were carried out on StepOnePlus equipment (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Standard curves for absolute quantification of HPV types and β -globin were generated in 10-fold serial dilutions (10^6 – 10^1 copies of genome) with synthetic oligonucleotides fragments of 150 bp (Thermo Fisher), designed from reference sequences of HPV genotypes and β -globin spanning the region between primers (GenBank ID: HPV16 - K02718, HPV18 - X05015, HPV31 - J04353, HPV33 - M12732, HPV45 - X74479, HPV 52 - X74481, HPV58 - D90400, β -globin - NC_000011.10). The viral load, expressed in copies per cell (c/c) was obtained dividing HPV copy number by half of the β -globin copy number, and was categorized as low (1–10 c/c), moderate (11–100 c/c), high (101–1000 c/c) or very high (> 1000 c/c) [22]. HPV viral load was log-transformed (\log_{10}) to graphic representation.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS 20.0 software for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL). Groups were compared using the Chi-square test or the Fisher exact test for qualitative characteristics, and using the Mann–Whitney and Kruskal Wallis tests for continuous ones. A p -value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

A total of 273 black women participated in this study and HPV DNA was detected in 11.4% (31/273) of them. The behavioral and demographic information about the women enrolled in the study are shown in Table 1. The age of patients ranged from 15 to 79 years, with a mean age of 41.9 ± 14.2 years.

Cytological results were obtained from 263 and 7.6% (20/263) presented cytological abnormalities. Ten of HPV positive samples (32.3%) presented cytological abnormalities (OR = 10.57, 95% CI 3.95 to 28.28, $p < 0.001$).

Thirty-one distinct HPV genotypes were identified, and HR-HPV occurred in 64.5% (20/31) of the samples (Table 2). HPV52 was the most prevalent HR type (16.1%), followed by 58, 59 (12.5% each), 31, 35, 39 and 53 types (9.4% each) (Fig. 1). Multiple infections occurred in 48.4% (15/31), with up to nine distinct genotypes. Considering only the HR-HPV infection, multiple types occurred in 38.7% (12/31) and, of these, 33.3% (4/

Table 1 Behavioral and demographic characteristics of black women from rural communities of Espírito Santo, Brazil ($n = 273$)

Characteristics	HPV negative (%) $n = 242$	HPV positive (%) $n = 31$	p
Distance from urban center (miles)			
≤ 6.21	45 (88.2)	6 (11.8)	0.92
> 6.21	197 (88.7)	25 (11.3)	
Use of contraceptive (Condom)			
Yes	65 (89)	8 (11)	0.90
No	177 (88.5)	23 (11.5)	
Number of sexual partner (last year)			
1	175 (87.1)	26 (12.9)	0.17
≥ 2	67 (93.1)	5 (6.9)	
Last Papanicolaou test			
≤ 12 months	50 (96.2)	2 (3.8)	0.09
> 12 months	192 (86.9)	29 (13.1)	

12) were present in cases with cytological abnormalities. Eighty percent of multiple infections occurred in women which reported to have only one sexual partner.

The viral load of HR-HPV positive samples, corresponding to the 9vHPV-related types, according to cytological results can be observed in Table 3. High and very high viral load was observed in all cytological results presenting HPV16, 31 and 52. Irrespective of genotype, high (102.0 c/c) and very high viral load (1527.54 c/c) were detected in HSIL and LSIL results, respectively, while low viral load was detected in normal (0.31 c/c) and ASCUS (0.64 c/c) results ($p = 0.04$) (Fig. 2).

Discussion

Especially for disadvantaged populations, as black women living in rural areas, little is known about cervical cancer, even less about HPV infection rates and types [10, 11]. In Brazil, there are 3386 communities of African descendants of enslaved blacks, distributed in 24 states [23], and little attention is given to the issue of sexually transmitted infection [10, 11]. In this study, we first show a low frequency of HPV infection in such women population but with a diversity of types and multiple infections, and a higher frequency of the HR-HPV 52 and 58 types over the HPV 16 type. Second, we demonstrate that the viral load of HR-HPV 9vHPV-related types increase between normal and cytological lesion.

We found an overall HPV frequency of 11.4% similar to the low HPV prevalence in similar Brazilian populations, of 12.6 and 13% [10, 11]. In women living also in rural areas worldwide, regardless of ethnicity, low rate ranging 10–26% was described [24–26]. Conversely, these rates contrasts with those found in urban centers worldwide, which varied from 27.7–52.7% [27–29], in

Table 2 HPV genotypes observed in black women, according to cytological data, from rural communities of Espírito Santo, Brazil

Cytology ^a	No of samples	HPV genotypes ^b
ASCUS	3	52 (2)/ 33 , 42, 52 , 53, 58
LSIL	4	6/ 61/ 31 , 35, 44, 54, 70/ 6, 16 , 31 , 35, 39, 56, 61, 66, 84
HSIL	3	16 / 52 / 11, 26, 35, 58
Normal	21	6/ 53/ 54/ 58 (2)/ 61 (2)/ 62/ 72/ 83/ 6, 42/, 33 , 51/ 51, 59/ 53, 82/ 72, 81, 106/ 6, 59, 82/ 18 , 52 , 59/ 6, 30, 39, 44, 67/ 18 , 26, 45 , 59, 61/ 31 , 42, 44, 70, 83/ 39, 45 , 66, 70, 72

^aASCUS, atypical squamous cells of undetermined significance; LSIL, low-grade squamous intraepithelial lesion; HSIL, high-grade squamous intraepithelial lesion

^bNumber of samples in parentheses, when greater than one; Types in multiple infection are between comma; Samples are slash-separated; 9vHPV-related types are highlighted

part suggesting that limited contact with urban centers could restrict the rate of HPV infection.

On the other hand, a high diversity of genotypes ($n = 31$) and multiple HPV-types infection (48.4%) occurred among the black rural women. Considering only the HR-HPV infection, multiple types (38.7%) were higher than that described in those studies with similar black rural women [10, 11]. Worldwide, multiple infection rates in women from urban centers, independent of lesion grade, have ranged from 16.7–41.8% [27–31]. There is no consensus whether the HPV types in multiple infections occur in a competitive or cooperative relationship. While Trottier et al. (2006) [32] suggest that an

interaction between HPV types can increase the risk of lesion, other studies did not show an association with multiple HPV infection [33, 34].

In our study, HPV52 and 58 were the most frequent HR-HPV types, similar to those observed in black rural women of Northeastern Brazil [10, 11]. Sammarco and colleagues (2016) also found HPV58 as most frequent genotype, although in a population different from our study [35]. Interestingly, studies regarding HPV genotypes among different ethnic populations, have reported that HPV16 and 18 were less prevalent among Hispanic and non-Hispanic black women compared to non-Hispanic white women [36, 37]. These data are also supported by

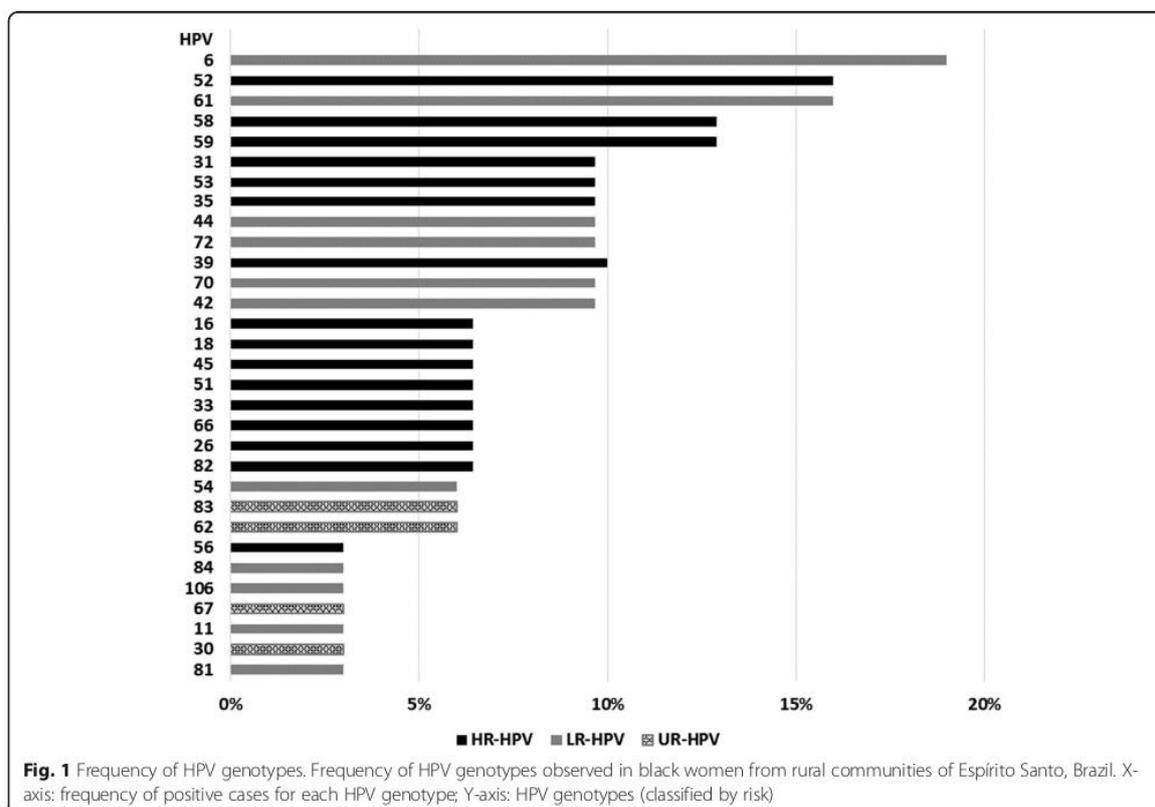


Fig. 1 Frequency of HPV genotypes. Frequency of HPV genotypes observed in black women from rural communities of Espírito Santo, Brazil. X-axis: frequency of positive cases for each HPV genotype; Y-axis: HPV genotypes (classified by risk)

Table 3 Viral load classification according to HR-HPV types and correspondent cytological results of black women from rural communities of Espírito Santo, Brazil

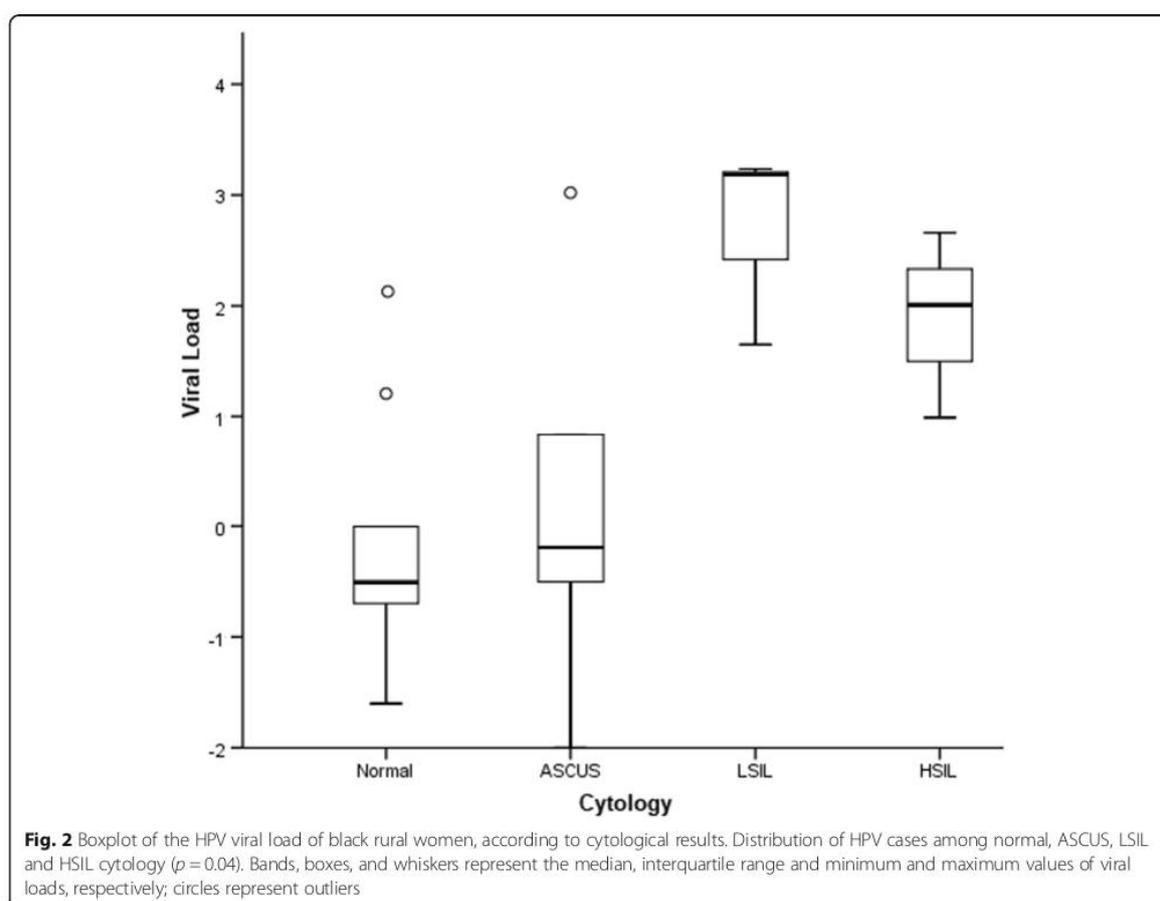
Cytology ^b	Viral load ^a	HPV type
ASCUS	Low	33, 52 (2), 58
	Very high	52
LSIL	Moderate	31
	Very high	16, 31
HSIL	Low	58
	High	16, 52
Normal	Low	18 (2), 33, 45, 58 (2), 45
	Moderate	31
	High	52

^alow (1–10 c/c), moderate (11–100 c/c), high (101–1000 c/c) or very high (> 1000 c/c)

^bASCUS, atypical squamous cells of undetermined significance; LSIL, low-grade squamous intraepithelial lesion; HSIL, high-grade squamous intraepithelial lesion

studies with African women from Kenya and Mozambique, which showed the HPV58 followed by HPV16, HPV53 and HPV18 types, and the HPV52 followed by HPV35, 16 and 53 as the most frequent in that population, respectively [38, 39]. However, it is unclear why these women are less likely to be infected with HPV16 and 18. Vidal et al. (2014) [36] suggest that African descendant women, which harbor others HR-HPV than HR-HPV16 and 18, maybe more resistant or have lower exposure to infection by HR-HPV16 and 18. Other factors, as the composition of vaginal and cervical microbiota, may influence on the acquisition of certain types of HR-HPV, playing a role in the persistence of HPV and development and progression to cervical lesion [40, 41]. Besides, the ethnicity/race may influence the vaginal microbiota and *Lactobacillus*-dominated cervical microbiota is less common among African women [42–44].

Our results also draw attention to a greater benefit in the use of the 9vHPV vaccine to the detriment of the 2vHPV or 4vHPV in the prevention of cervical cancer in black women, at least from rural communities, because



it contemplates the most frequent HR-HPV types that infect the black rural population (HPV52 and 58). Therefore, these findings may contribute with public health politics regarding the election of vaccines for specific populations.

We also showed that the viral load of HR-HPV 9vHPV-related types was higher in cases with cervical lesion than in normal cytology ($p = 0.04$). Most of the studies investigated HPV16 viral load, and some of them showed the association between an increase of the viral load and the cervical lesion [45, 46]. The data on the viral load of HR-HPV other than HPV16 also showed similar results [13, 47, 48]. It is noteworthy that different HPV genotypes may have different mechanism to develop a high-grade cervical lesion and the viral load can modify the risk of precancerous disease [33]. This fact was demonstrated by Adcock and colleagues that, considering only the genotypes, the HPV16, 33 and 31 had greatest risk of pre-cancerous disease, and high viral loads for HPV18, 35, 52 and 58 carried more risk than intermediate levels for HPV16, 31 and 33 [33]. It is important to highlight that we observed a high and very high viral load of HPV 52 (the most frequent HPV genotype in this population) in normal and ASCUS results in women with a mean age of 42 years, living in semi-isolated regions and with little access to health services. According to Brazilian guidelines for cervical cancer screening, repeat cytology is the management for such cytological results. However, considering our population studied and the low sensitivity of cytology, the HR-HPV test carried out simultaneously with viral load test could be useful to identify these women at higher risk of developing cervical lesions, increasing the interval of screening or referring them to immediate colposcopy instead repeat cytology.

This study had some limitations as the lack of cytological data for all participants, the absence of cervical histologic data, to confirm the precancerous lesions, as well as the small sample size due to difficulty of access to rural communities. However, we believe that the data provide valuable information about the profile of HPV infection in such population.

Conclusions

In conclusion, our data show a low frequency of HPV infection in black women from rural semi-isolated communities, and the HR-HPV52 and 58 as the most types in contrast to HPV16. We also demonstrate an increase of HPV viral load of the 9vHPV-related types with cervical lesions cases. We believe that these findings may assist in the strategies for cervical cancer prevention, especially for disadvantaged populations.

Abbreviations

9vHPV: Nonavalent HPV vaccine; ASCUS: Atypical squamous cells of undetermined significance; c/c: Copies per cell; HSL: High-grade squamous intraepithelial lesion; HPV: Human papillomavirus; HR-HPV: High-risk HPV; LR-HPV: Low-risk HPV; qPCR: Quantitative real-time PCR; RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism; RLB: Reverse Line Blot; STI: Sexually transmitted infection; UR-HPV: Undetermined-risk HPV

Acknowledgements

Not applicable.

Authors' contributions

LCS and AEM conceptualized the study and critically revised the manuscript. JAD performed the data and sample collection. MCLFS was responsible for cytology reporting. LPBV and LBF conducted DNA extraction, PCR, HPV genotyping and qPCR. LPBV conducted the data analysis, interpretation and manuscript writing. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by Foundation for Research and Innovation Support of Espírito Santo State (FAPES, Grant numbers 86/2017 and 203/2018). The first author had a scholarship from FAPES. The funders had no role in the study design and collection, analysis and interpretation of data, and writing the manuscript.

Availability of data and materials

The data sets used and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

This research obtained approval by the Ethical Research Council of the Center of Health Sciences of the Federal University of Espírito Santo, Brazil (Protocols n. 1.308.539 and 2.925.384). All participants signed an informed consent agreement. All the minors enrolled in this study and their parents/guardians signed the agreement consent (Resolution 466/12 of the National Health Council and its complementary) after the explanation of the study objectives.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Infectious Diseases Post-Graduate Program, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil. ²Department of Nursing, University Center of Northern Espírito Santo, Federal University of Espírito Santo, São Mateus, Brazil. ³Multivix Faculty, Vitória, Brazil. ⁴Department of Pathology, Center of Health Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil. ⁵Department of Social Medicine, Center of Health Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil.

Received: 1 October 2020 Accepted: 5 April 2021

Published online: 17 April 2021

References

- Centers for Disease Control and Prevention. Genital HPV infection—CDC fact sheet, vol. 1. Atlanta, GA: CDC; 2012. CDC Fact Sheets 2014;1–2 [cited 2019 Dec 16]. Available from: <https://www.cdc.gov/std/hpv/HPV-FS-July-2017.pdf>
- Muñoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006;24:1–10.
- Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007;121(3):621–32. <https://doi.org/10.1002/ijc.22527>.
- Bruni L, Albero G, Serrano B, Mena M, Gómez D, Muñoz J, et al. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human

- Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report 17 June 2019 [cited 2020 Mar 9]. Available from: <https://www.hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>.
5. Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L, de Sanjosé S, Saraiya M, Ferlay J, et al. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *Lancet Glob Health*. 2020;8(2):e191–203. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30482-6](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30482-6).
 6. Arbyn M, Raifu AO, Weiderpass E, Bray F, Anttila A. Trends of cervical cancer mortality in the member states of the European Union. *Eur J Cancer*. 2009;45(15):2640–8. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2009.07.018>.
 7. Wentzensen N, Arbyn M, Berkhof J, Bower M, Canfell K, Einstein M, et al. Eurogin 2016 roadmap: how HPV knowledge is changing screening practice. *Int J Cancer*. 2017;140(10):2192–200. <https://doi.org/10.1002/ijc.30579>.
 8. Brasil, Ministério da Saúde/INCA [Internet]. Câncer do colo do útero, estatísticas. 2019 [cited 2019 Dec 17]. Available from: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-uterio>.
 9. Musselwhite LW, Oliveira CM, Kwaramba T, Pantano NDP, Smith JS, Reis RM, et al. Racial/ethnic disparities in cervical Cancer screening and outcomes. *Acta Cytol*. 2016;60(6):518–26. <https://doi.org/10.1159/000452240>.
 10. Batista JE, Saddy VA, Carvalho KPA, Ribeiro AA, Segati KD, Carneiro MADS, et al. Human papillomavirus genotypes 68 and 58 are the most prevalent genotypes in women from Quilombo communities in the state of Maranhão. *Brazil Int J Infect Dis*. 2017;55:51–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.01.001>.
 11. Nascimento SD, Brandão VFCB, da Silva MAC N, Batista JE, MCL LB, et al. prevalence of human papillomavirus infection among women from Quilombo communities in northeastern Brazil. *BMC Womens Health*. 2018;18(1):1–10. <https://doi.org/10.1186/s12905-017-0499-3>.
 12. Schiffman M, Wentzensen N, Wacholder S, Kinney W, Gage JC, Castle PE. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(5):368–83. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq562>.
 13. Marongiu L, Godi A, Parry JV, Beddows S. Human papillomavirus 16, 18, 31 and 45 viral load, integration and methylation status stratified by cervical disease stage. *BMC Cancer*. 2014;14(1):384. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-384>.
 14. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda system: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. 2002;287(16):2114–9. <https://doi.org/10.1001/jama.287.16.2114>.
 15. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Hildesheim A, Schiffman MH, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*. 2000;38(1):357–61.
 16. Huang SZ, Sheng M, Zhao JQ, Qiu XK, Zeng YT, Wang QS, et al. Detection of sickle cell gene by analysis of amplified DNA sequences. *Yi Chuan Xue Bao*. 1989;16(6):475–82.
 17. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis*. 1994 Nov;170(5):1077–85. <https://doi.org/10.1093/infdis/170.5.1077>.
 18. Estrade C, Menoud PA, Nardelli-Haeffliger D, Sahli R. Validation of a low-cost human papillomavirus genotyping assay based on PGMV PCR and reverse blotting hybridization with reusable membranes. *J Clin Microbiol*. 2011 Oct;49(10):3474–81. <https://doi.org/10.1128/JCM.05039-11>.
 19. Gravitt PE, Peyton C, Wheeler C, Apple R, Higuchi R, Shah KV. Reproducibility of HPV 16 and HPV 18 viral load quantitation using TaqMan real-time PCR assays. *J Virol Methods*. 2003 Sep;112(1–2):23–33. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(03\)00186-1](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(03)00186-1).
 20. Winer RL, Xi LF, Shen Z, Stern JE, Newman L, Feng Q, et al. Viral load and short-term natural history of type-specific oncogenic human papillomavirus infections in a high-risk cohort of midadult women. *Int J Cancer*. 2014;134(8):1889–98. <https://doi.org/10.1002/ijc.28509>.
 21. Köressaar T, Lepamets M, Kaplinski L, Raine K, Andreson R, Remm M. Primer3_masker: integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics*. 2018;34(11):1937–8. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty036>.
 22. Schlecht NF, Trevisan A, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, et al. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*. 2003;103(4):519–24. <https://doi.org/10.1002/ijc.10846>.
 23. Brasil. Fundação Cultural Palmares [Internet]. Certificação Quilombola [cited 2020 Mar 6]. Available from: http://www.palmares.gov.br/?page_id=37551.
 24. de Lima SV, de Mesquita AM, Cavalcante FG, Silva ZP, Hora V, Diedrich T, et al. Sexually transmitted infections in a female population in rural north-East Brazil: prevalence, morbidity and risk factors. *Tropical Med Int Health*. 2003;8(7):595–603.
 25. Sovjanya AP, Jain M, Poli UR, Padma S, Das M, Shah KV, et al. Prevalence and distribution of high-risk human papilloma virus (HPV) types in invasive squamous cell carcinoma of the cervix and in normal women in Andhra Pradesh. *BMC Infect Dis*. 2005;5(1):116. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-5-116>.
 26. Thapa N, Maharjan M, Shrestha G, Maharjan N, Petrini MA, Zuo N, et al. Prevalence and type-specific distribution of human papillomavirus infection among women in mid-western rural, Nepal- A population-based study. *BMC Infect Dis*. 2018;18(1):338. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3175-9>.
 27. Pista A, Oliveira A, Verdasca N, Ribeiro F. Single and multiple human papillomavirus infections in cervical abnormalities in Portuguese women. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(6):941–6. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03387.x>.
 28. Coser J, da Rocha BT, Simon D, Kazantzi Fonseca a S, Ikuta N, lunge VR. Prevalence and genotypic diversity of cervical human papillomavirus infection among women from an urban center in Brazil. *Genet Mol Res*. 2013;12(4):4276–85. <https://doi.org/10.4238/2013>.
 29. Wheeler CM, Hunt WC, Cuzick J, Langsfeld E, Pearce A, Montoya GD, et al. A population-based study of human papillomavirus genotype prevalence in the United States: baseline measures prior to mass human papillomavirus vaccination. *Int J Cancer*. 2013;132(1):198–207. <https://doi.org/10.1002/ijc.27608>.
 30. Martín P, Kilany L, García D, López-García AM, Martín-Azaña MJ, Abreira V, et al. Human papillomavirus genotype distribution in Madrid and correlation with cytological data. *BMC Infect Dis*. 2011;11(1):316. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-316>.
 31. Sammarco ML, Del Riccio I, Tamburro M, Grasso GM, Ripabelli G. Type-specific persistence and associated risk factors of human papillomavirus infections in women living in Central Italy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013;168(2):222–6. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2013.01.012>.
 32. Trottier H, Mahmud S, Costa M, Sobrinho JP, Duarte-Franco E, Rohan TE, et al. Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical Neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 2006;15(7):1274–80. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0129>.
 33. Adcock R, Cuzick J, Hunt WC, McDonald RM, Wheeler CM, Wheeler CM. Role of HPV genotype, multiple infections, and viral load on the risk of high-grade cervical Neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 2019;28(11):1816–24. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-19-0239>.
 34. Wentzensen N, Schiffman M, Dunn ST, Zuna RE, Gold MA, Allen RA, et al. Multiple HPV genotype infections in cervical cancer progression in the study to understand cervical Cancer early endpoints and determinants (SUCCEED). *Int J Cancer*. 2009;125(9):2151–8. <https://doi.org/10.1002/ijc.24528>.
 35. Sammarco ML, Ucciferri C, Tamburro M, Falasca K, Ripabelli G, Vecchietti J. High prevalence of human papillomavirus type 58 in HIV infected men who have sex with men: a preliminary report in Central Italy. *J Med Virol*. 2016;88(5):911–4. <https://doi.org/10.1002/jmv.24406>.
 36. Vidal AC, Smith JS, Valea F, Bentley R, Gradison M, Yamall KSH, et al. HPV genotypes and cervical intraepithelial neoplasia in a multiethnic cohort in the southeastern USA. *Cancer Causes Control*. 2014;25(8):1055–62. <https://doi.org/10.1007/s10552-014-0406-2>.
 37. Montealegre JR, Varier I, Bracamontes CG, Dillon LM, Guillaud M, Sikora AG, et al. Racial/ethnic variation in the prevalence of vaccine-related human papillomavirus genotypes. *Ethn Health*. 2019;24(7):804–15. <https://doi.org/10.1080/13557858.2017.1373073>.
 38. De Vuyst H, Parisi MR, Karani A, Mandaliya K, Muchiri L, Vaccarella S, et al. The prevalence of human papillomavirus infection in Mombasa. *Kenya Cancer Causes Control*. 2010;21(12):2309–13. <https://doi.org/10.1007/s10552-010-9645-z>.
 39. Edna Omar V, Orvalho A, Nália I, Kaliff M, Lillsunde-Larsson G, Ramqvist T, et al. Human papillomavirus prevalence and genotype distribution among young women and men in Maputo city. *Mozambique BMJ Open*. 2017;7(7):e015653. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-015653>.

40. Mitra a, D a MI, Lee YS, Smith a, Marchesi JR, Lehne B, et al. Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. *Sci Rep.* 2015;5:16865. <https://doi.org/10.1038/srep16865>.
41. Huang X, Li C, Li F, Zhao J, Wan X, Wang K, et al. Cervicovaginal microbiota composition correlates with the acquisition of high-risk human papillomavirus types. *Int J Cancer.* 2018;143(3):621–34. <https://doi.org/10.1002/ijc.31342>.
42. Fettweis JM, Brooks JP, Serrano MG, Sheth NU, Girerd PH, Edwards DJ, et al. Differences in vaginal microbiome in African American women versus women of European ancestry. *Microbiology.* 2014;160(10):2272–82. <https://doi.org/10.1099/mic.0.081034-0>.
43. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SSK, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(Suppl. 1):4680–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002611107>.
44. Zhou X, Brown CJ, Abdo Z, Davis CC, Hansmann MA, Joyce P, et al. (2007) differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. *ISME J.* 2007;1(2):121–33. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.12>.
45. Hesselink AT, Berkhof J, Heideman DA, Bulkman NW, Van Tellingen JE, Meijer CJ, et al. High-risk human papillomavirus DNA load in a population-based cervical screening cohort in relation to the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Int J Cancer.* 2009; 124(2):381–6. <https://doi.org/10.1002/ijc.23940>.
46. Xi LF, Hughes JP, Castle PE, Edelstein ZR, Wang C, Galloway DA, et al. Viral load in the natural history of human papillomavirus type 16 infection: a nested case-control study. *J Infect Dis.* 2011;203(10):1425–33. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir049>.
47. Flores R, Papenfuss M, Klimedki WT, Giuliano AR. Cross-sectional analysis of oncogenic HPV viral load and cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer.* 2006;118(5):1187–93. <https://doi.org/10.1002/ijc.21477>.
48. Kim J, Kim BK, Jeon DS, Lee CH, Roh JW, Kim JY, et al. Type-specific viral load and physical state of HPV type 16, 18, and 58 as diagnostic biomarkers for high-grade squamous intraepithelial lesions or cervical cancer. *Cancer Res Treat.* 2019;52(2):396–405. <https://doi.org/10.4143/crt.2019.152>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



6.2 MANUSCRITOS A SEREM SUBMETIDOS

6.2.1 Resultados referentes à distribuição dos genótipos e variantes de HPV16 em mulheres HIV-positivas no Brasil.

Infecção cervical por HPV em mulheres HIV-positivas: um estudo multicêntrico

Lays Paula Bondi Volpini^{1*}, Luciana Bueno de Freitas², Angelica Espinosa Miranda^{1,3}, Liliana Cruz Spano^{1,4}.

¹Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória (ES), Brasil.

²Faculdade Multivix, Vitória (ES), Brasil

³Departamento de Medicina Social, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória (ES), Brasil.

⁴Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória (ES), Brasil.

*Autor correspondente:

E-mail: layspaula90@gmail.com

RESUMO

A infecção persistente pelo papilomavírus humano de alto risco (HR-HPV) é o principal fator de risco para o desenvolvimento de câncer do colo do útero (CCU), terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres em todo o mundo. Mulheres soropositivas para HIV têm risco aumentado para o CCU devido à maior persistência da infecção por HPV. Em geral, o HR-HPV mais frequente no CCU é o HPV16, mas a prevalência dos genótipos do HPV varia de acordo com a região geográfica e da população estudada. O objetivo desse estudo foi avaliar a prevalência de genótipos de HPV e variantes do HPV16 em mulheres HIV-positivas atendidas em Centros de Referência em Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS (CR-DST/AIDS) em diferentes regiões do Brasil. Foi realizado estudo descritivo a partir de amostras cervicais de mulheres HIV-positivas de oito estados brasileiros, previamente positivas para HR-HPV, de março a dezembro de 2015. O DNA viral foi amplificado por PCR utilizando o conjunto de iniciadores PGMY09/11-bio. Hibridização reversa em linhas (*Reverse Line Blot* - RLB) e polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP) foram usados para determinar os genótipos de HPV. As variantes do HPV16 foram identificadas por sequenciamento gênico. No total, foram identificados 30 genótipos distintos de HPV em 172 amostras, e os genótipos mais frequentes foram HPV 16 (29,1%), 52 (15%), 31 (14%), 18 e 53 (13% cada). O HPV16 foi o tipo mais frequente nos estados da Bahia, Pernambuco, Distrito Federal, Rio Grande do Sul e Paraná, predominando a variante Europeia. Demonstramos o perfil dos genótipos e variantes do HPV16 em mulheres brasileiras HIV-positivas, informações importantes principalmente para monitorar a eficácia das vacinas atualmente licenciadas.

Palavras-chave: HPV, HIV, Genótipos, Variantes

INTRODUÇÃO

A associação entre a infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV) de alto risco (HR) e o câncer do colo do útero (CCU) está bem estabelecida (Walboomers et al., 1999). O CCU é o terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres em todo o mundo, ocorrendo 569.847 novos casos e 311.365 mortes em 2018 (Bruni et al., 2019). No Brasil, o CCU é o terceiro tipo de câncer mais comum em mulheres, com aproximadamente 16.590 novos casos em 2020 (Brasil, 2019).

Particularmente, a infecção por HPV é onerosa para mulheres infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), com maior incidência e persistência da infecção, diminuição da resolução e aumento do risco de CCU (Strickler et al., 2005; Clifford et al., 2016). Em comparação com mulheres HIV-negativas, o risco de desenvolvimento e mortalidade devido ao CCU é 5,4 vezes e 2 vezes maior, respectivamente, em mulheres HIV-positivas (Frisch et al., 2000; Coghill et al., 2015).

Em geral, o HR-HPV mais frequente no CCU é o HPV16, encontrado em aproximadamente 50% dos casos (Li et al., 2011). No entanto, a prevalência de genótipos de HPV varia de acordo com a região geográfica e da população estudada. Além disso, as variantes descritas dentro do mesmo genótipo podem diferir em suas propriedades biológicas e em seu potencial oncogênico. As mais estudadas são as variantes do HPV16, classificadas em Europeias (E) e não Europeias (NE) (Africana, Asiática, Asiático-americana e Norte-americana), de acordo com sua distribuição geográfica e potencial oncogênico (Ho et al., 1993; Yamada et al., 1995).

A prevalência e os fatores de risco para infecção por HR-HPV nesta população foram previamente determinados (Miranda et al., 2017). Tendo em vista que a avaliação da prevalência e genótipos do HPV em diferentes populações e regiões são fundamentais para o estabelecimento de políticas públicas de saúde e desenvolvimento de vacinas, objetivamos

agora, avaliar a prevalência de genótipos e variantes do HPV16 em mulheres HIV-positivas atendidas em Centros de Referência para Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS (CR-DST/AIDS) em diferentes regiões do Brasil.

MÉTODOS

Pacientes, amostras e aspectos éticos

Este é um descritivo, em corte transversal, realizado em mulheres positivas para HIV, de 18 a 49 anos, atendidas CR-DST/AIDS de oito estados brasileiros (Amazonas, Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Paraná, Pernambuco, Brasil. Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul), de março a dezembro de 2015. Os dados clínicos, comportamentais e demográficos dessas mulheres foram obtidos previamente (Miranda et al., 2017).

Foram utilizadas 187 amostras cervicais positivas para HR-HPV obtidas após teste com COBAS HPV test (Roche), que detecta 12 genótipos HR-HPV (HPV31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68) e discrimina genótipos 16 e 18 (Miranda et al., 2017). As amostras HR-HPV positivas foram mantidas em freezer a -70°C até as análises de PCR. Para a citopatologia, os espécimes foram encaminhados aos Laboratórios de Patologia de cada local de coleta, fixados em solução de formalina tamponada a 10%, e os achados citológicos foram interpretados de acordo com os critérios definidos no sistema Bethesda (Solomon et al., 2002).

Esta pesquisa obteve aprovação do Conselho de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil (número de protocolo 282.864/2013 e 2.4459.88/2017). Todas as mulheres incluídas no estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Procedimentos laboratoriais

A extração do DNA do HPV foi realizada utilizando o kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, e a detecção do HPV foi realizada por PCR com o conjunto de iniciadores PGMY09/11-bio (Gravitt et al., 2000). A PCR para o gene da β -globina (Huang et al., 1989) foi realizada em amostras negativas para HPV como um controle de extração e para avaliar a integridade do DNA.

Os ensaios de RLB (Estrade et al., 2011) e RFLP (Bernard et al., 1994) foram usados para genotipagem do HPV, classificados como de alto risco (HR-HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59), baixo risco (LR-HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e 89) e risco indeterminado (IR-HPV HPV 2a, 3, 7, 10, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 55, 57, 62, 67, 69, 71, 74, 77, 83, 84, 85, 86, 87, 90 e 91) (Muñoz et al., 2006). Os genótipos considerados prováveis oncogênicos (26, 53, 66, 68, 73 e 82) (Muñoz et al., 2006) foram agrupados com HR-HPV.

As variantes de HPV16 foram determinadas por sequenciamento gênico usando o kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), após PCR para a região *LCR* do HPV16 (Chen, Freitas e Burk, 2015) que amplifica um fragmento comum das variantes deste genótipo. As sequências obtidas foram editadas usando o software BioEdit v7.2.5 (Hall et al., 1999) e, em seguida, alinhadas com as sequências de referência do HPV16 para cada sublinhagem (Burk et al., 2013) usando o programa SeaView v4.5.4 (Gouy et al., 2010). A construção da árvore filogenética de todas as sequências alinhadas pelo método de *neighbour-joining* foi realizada por meio do software MEGA v6.0 (Tamura et al., 2013).

RESULTADOS

Foram analisadas 187 amostras previamente positivas para HR-HPV pelo COBAS HPV test. Os dados sociodemográficos e clínicos da população do estudo estão apresentados na Tabela 1. Devido à falta de dados para algumas variáveis do estudo, o tamanho da amostra variou em cada análise. Os resultados citológicos foram obtidos em 93,6% (161/172) das amostras analisadas e alterações citológicas (\geq ASCUS) foram observadas em 23% (37/161) (Tabela 1).

Tabela 1. Características demográficas e clínicas de mulheres HIV-positivas, atendidas em CRDST/AIDS.

Características	N (%)
Demográficas	
Idade (n= 176)	
<30 anos	62 (35,2)
\geq 30 anos	114 (64,8)
Escolaridade (n=175)	
<8 anos	71 (40,6)
\geq 8 anos	104 (59,4)
Estado civil (n= 176)	
Casada	98 (55,7)
Solteira/Divorciada/Viúva	78 (44,3)
Clínicas	
Uso de TARV ^a (n= 176)	152 (86,4)
Carga viral de HIV, copies/mL (n=171)	
<40 (indetectável)	102 (59,6)
\geq 40 (detectável)	69 (40,4)
Contagem de CD4, /mm ³ (n=109)	
<500	78 (45,6)
\geq 500	93 (54,4)
Citologia ^b (n= 161)	
Normal	124 (77)
ASCUS	8 (5)
LSIL	19 (11,8)
HSIL	10 (6,2)
IST prévia ^c (n= 174)	100 (57,6)

^aTerapia Antirretroviral; ^bASCUS, células escamosas atípicas com significado indeterminado; LSIL, lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; HSIL, lesão intraepitelial escamosa de alto grau; ^cIST, infecção sexualmente transmissível.

O HPV foi detectado em 92% (172/187) das amostras positivas para o COBAS. As amostras positivas para HPV foram genotipadas pelo RLB, que determinou o genótipo para 98,8% das amostras (170/172). As duas amostras restantes foram genotipadas por RFLP. No total, foram identificados 30 genótipos distintos de HPV, 18 genótipos classificados como HR-HPV, incluindo os genótipos “prováveis oncogênicos”, sete como LR-HPV e cinco como IR-HPV (Tabela 2). Em geral, os genótipos mais frequentes foram HPV 16 (29,1%), 52 (15%), 31 (14%), 18 e 53 (13% cada). HPV16 foi o tipo mais frequente nos estados da Bahia (juntamente com HPV18, com 23%), Pernambuco (30%), Distrito Federal (52%), Rio Grande do Sul (38%) e Paraná (juntamente com HPV52, com 25%) (Tabela 2).

Tabela 2 - Genótipos de HPV, determinados por RLB e RFLP, de 172 mulheres HIV-positivas

HPV ^a	Brasil n (%)	Estado ^b n (%)							
		AM	PE	BA	ES	RJ	DF	PR	RS
HR-HPV									
16	50 (29,1)	-	7 (30,4)	6 (23,1)	5 (20)	4 (25)	13 (52)	7 (25)	8 (38,1)
52	26 (15,1)	1 (12,5)	3 (13)	2 (7,7)	2 (8)	5 (31,2)	3 (12)	7 (25)	3 (14,3)
31	24 (14)	2 (25)	5 (21,7)	2 (7,7)	6 (24)	4 (25)	2 (8)	3 (10,7)	-
18	22 (12,8)	2 (25)	1 (4,3)	5 (19,2)	3 (12)	1 (6,3)	7 (28)	2 (7,1)	1 (4,8)
53	22 (12,8)	-	6 (26,1)	5 (19,2)	3 (12)	4 (25)	2 (8)	2 (7,1)	-
58	18 (10,5)	-	1 (4,3)	2 (7,7)	3 (12)	3 (18,8)	1 (4)	4 (14,3)	4 (19)
56	17 (9,9)	-	3 (13)	1 (3,8)	4 (16)	3 (18,8)	3 (12)	2 (7,1)	2 (9,5)
45	17 (9,9)	2 (25)	1 (4,3)	4 (15,4)	3 (12)	1 (6,3)	-	4 (14,3)	2 (9,5)
35	16 (9,3)	-	-	3 (11,5)	4 (16)	1 (6,3)	4 (16)	2 (7,1)	2 (9,5)
51	15 (8,7)	1 (12,5)	4 (17,4)	2 (7,7)	-	1 (6,3)	2 (8)	3 (10,7)	2 (9,5)
59	14 (8,1)	-	3 (13)	3 (11,5)	2 (8)	3 (18,8)	2 (8)	1 (3,6)	-
66	11 (6,4)	-	2 (8,7)	1 (3,8)	1 (4)	2 (12,5)	-	2 (7,1)	3 (14,3)
33	10 (5,8)	2 (25)	-	-	1 (4)	1 (6,3)	2 (8)	3 (10,7)	1 (4,8)
39	9 (5,2)	-	-	2 (7,7)	2 (8)	1 (6,3)	3 (12)	-	1 (4,8)
68	7 (4,1)	-	1 (4,3)	2 (7,7)	-	-	2 (8)	2 (7,1)	-
26	5 (2,9)	-	-	-	-	3 (18,8)	-	2 (7,1)	-
73	5 (2,9)	-	-	-	1 (4)	2 (12,5)	-	2 (7,1)	-
82	4 (2,3)	1 (12,5)	-	-	1 (4)	-	1 (4)	1 (3,6)	-
LR-HPV									
6	14 (8,1)	-	4 (17,4)	-	1 (4)	1 (6,3)	2 (8)	2 (7,1)	4 (19)
44	14 (8,1)	-	1 (4,3)	1 (3,8)	6 (24)	1 (6,3)	2 (8)	1 (3,6)	2 (9,5)
42	8 (4,7)	-	4 (17,4)	2 (7,7)	1 (4)	1 (6,3)	-	-	-
70	8 (4,7)	-	1 (4,3)	2 (7,7)	1 (4)	-	1 (4)	3 (10,7)	-
11	5 (2,9)	-	1 (4,3)	-	-	1 (6,3)	-	2 (7,1)	1 (4,8)
54	4 (2,3)	-	-	3 (12)	-	-	-	-	1 (4,8)
81	1 (0,6)	-	-	1 (3,8)	-	-	-	-	-
IR-HPV									
69	8 (4,7)	1 (12,5)	1 (4,3)	1 (3,8)	2 (8)	-	-	3 (10,7)	-
34	2 (1,2)	-	2 (8,7)	-	-	-	-	-	-
84	2 (1,2)	-	-	1 (3,8)	-	1 (6,3)	-	-	-
62	1 (0,6)	-	-	-	1 (4)	-	-	-	-
83	1 (0,6)	-	-	-	1 (4)	-	-	-	-
Total	172	8	23	26	25	16	25	28	21

^aHR-HPV, HPV de alto risco; LR-HPV, HPV de baixo risco; IR-HPV, HPV de risco indeterminado

^bAM, Amazonas; PE, Pernambuco; BA, Bahia; ES, Espírito Santo; RJ, Rio de Janeiro; DF, Distrito Federal; PR, Paraná; RS, Rio Grande do Sul

As variantes do HPV16 foram determinadas para as 50 amostras positivas de HPV16, predominando a variante Europeia (Tabela 3). A figura 2 mostra a árvore filogenética com as sequências de nucleotídeos obtidas neste estudo em comparação com as sequências de referência de cada linhagem de HPV16.

Tabela 3. Distribuição das variantes do HPV16 em mulheres HIV-positivas de acordo o estado brasileiro.

Estados	Variantes				Total
	Europeia	Africana 1a	Africana 2a	Asiática-americana 1	
Espírito Santo	4	-	-	1	5
Rio de Janeiro	3	-	1	-	4
Bahia	6	-	-	-	6
Pernambuco	7	-	-	-	7
Rio Grande do Sul	8	-	-	-	8
Paraná	6	-	-	1	7
Distrito Federal	10	1	-	2	13
Total	44 (88%)	1 (2%)	1 (2%)	4 (8%)	50 (100%)

DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos a prevalência de genótipos de HPV e variantes de HPV16 em mulheres HIV-positivas atendidas em CR-DST/AIDS em oito estados brasileiros, representando as cinco regiões geográficas do país. Todas as amostras analisadas neste estudo são provenientes de um estudo anterior que avaliou a prevalência de infecção HR-HPV por meio da metodologia COBAS[®] HPV (Roche Diagnostics), que detecta HR-HPV16, 18 e outros 12 HR-HPV sem discriminar entre eles (HPV31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68) (Miranda et al., 2017). Este é o primeiro estudo multicêntrico, de nosso conhecimento, sobre a distribuição de genótipos e variantes do HPV16 em mulheres brasileiras HIV-positivas.

Foram identificados 30 genótipos distintos de HPV, incluindo além de HR-HPV, também IR e LR-HPV, cuja diversidade variou de oito (Amazonas) a 22 genótipos (Espírito Santo e Paraná). Outros estudos brasileiros em algumas regiões geográficas, também revelaram uma grande diversidade (18-37 tipos) de genótipos de HPV em mulheres HIV-positivas (Cerqueira et al., 2007; Levi et al., 2014; Melgaço et al., 2009; Rocha-Bischiliari et al., 2017; Volpini et al., 2017). O HR-HPV mais frequente em nosso estudo foram os HPV 16, 52, 31, 18 e 53, semelhantes aos descritos por Clifford et al., (2006) em uma meta-análise da distribuição dos genótipos do HPV em mulheres HIV-positivas da América latina, representada por México e Brasil (HPV16, 68, 53, 18 e 52).

O HPV16 foi o tipo mais frequente nos estados da Bahia, Pernambuco, Distrito Federal, Rio Grande do Sul e Paraná, corroborando com resultados anteriores nessas regiões (Queiroz et al., 2004; Oliveira, P. et al., 2010; Cerqueira et al., 2007; Rocha-Bishiliari et al., 2014), com exceção de Pernambuco, em que Martins et al. (2014) descreveram o tipo 53 como o mais frequente. Os genótipos mais frequentes no Espírito Santo (HPV31) e no Rio de Janeiro (HPV52) representaram dados discordantes em relação a estudos anteriores que detectaram o HPV16 como o mais frequente nesses estados (Mattos et al., 2011; Melgaço et al., 2009;

Volpini et al., 2017). O HPV16 não foi detectado no Amazonas e os tipos mais frequentes foram 18, 31, 33 e 45. Em um estudo anterior, Teixeira et al., (2018) demonstraram que os tipos HR-HPV mais prevalentes foram 56, 59 e 66. Entretanto a discussão acerca dos tipos de HPV torna-se limitada dado ao pequeno número de amostras quando estratificado por estado. Além disso, é importante observar que, além da diversidade de genótipos de HPV encontrados de acordo com a região geográfica, a distribuição dos genótipos de HPV também pode variar de acordo com a técnica de genotipagem utilizada em cada estudo, uma vez que algumas metodologias se restringem à detecção de um número limitado de genótipos (Eide & Debaque, 2012).

A caracterização das variantes HPV16 apresentou maior prevalência da variante Europeia (88%) em comparação com as não Europeias (Africana e Asiático-americana), o mesmo observado em estudos de vários estados brasileiros em mulheres HIV-positivas (Cruz et al, 2004; Freitas et al., 2014; Sichero et al., 2007; Tamegão-Lopes et al., 2014; Volpini et al., 2017). De fato, a variante Europeia é a mais comum em todas as regiões do mundo, exceto na África subsaariana e na Ásia Oriental (Cornet et al., 2013). A distribuição mundial de variantes está relacionada à área geográfica, ao nível de mistura de cada população e aos padrões recentes de migração humana (Chen et al., 2011; Sichero et al., 2007). Além disso, a predominância das variantes Europeias neste estudo sugere um menor risco para o desenvolvimento do HSIL nessas mulheres quando comparadas àquelas positivas para variantes não Europeias (Sichero et al., 2007; Freitas et al., 2014).

A determinação do perfil da infecção por HPV é importante para monitorar a eficácia das vacinas atualmente licenciadas. Em 2014, o Ministério da Saúde incluiu a vacina quadrivalente do HPV no Calendário Nacional de Vacinação. Esta vacina é direcionada contra os genótipos mais frequentemente associados ao CCU (HR-HPV16 e 18) e verrugas genitais (LR-HPV6 e 11) na população em geral (Villa et al., 2006). No mesmo ano, o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou a vacina nonavalente, dirigida contra nove genótipos de HPV

(HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58), que juntos causam cerca de 90% dos casos de CCU e condiloma em todo o mundo (FDA, 2014). Portanto, de acordo com o perfil do HPV descrito neste estudo, as mulheres HIV-positivas brasileiras podem se beneficiar principalmente da vacina nonavalente.

Em conclusão, demonstramos o perfil dos genótipos do HPV e das variantes HPV16 em mulheres HIV-positivas brasileiras. Esses achados podem ser relevantes para a estratégias de rastreamento e vacinação voltada principalmente para essa população específica de mulheres em risco para o desenvolvimento do CCU.

REFERÊNCIAS

- Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, et al. Assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction, restriction digest, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Inf Dis*. 1994; 170: 1077–85.
- Brasil, Ministério da Saúde/INCA [Internet]. Câncer do colo do útero, estatísticas. 2019 [cited 2020 Dec 17]. Available from: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>.
- Bruni L, Albero G, Serrano B, Mena M, Gómez D, Muñoz J, et al. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report 17 June 2019 [cited 2020 Mar 9]. Available from: <https://www.hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>.
- Burk RD, Harari A, Chen Z. Human papillomavirus genome variants. *Virology*. 2013; 445: 232–43.
- Cerqueira DM, Moraes DDS, Camara GNL, Amaral F a., Oyama CNR, dos Santos MQC, et al. High HPV genetic diversity in women infected with HIV-1 in Brazil. *Arch Virol*. 2007;152(1):75–83.
- Chen Z, Freitas LB, Burk RD. Evolution and classification of oncogenic human papillomavirus types and variants associated with cervical cancer. *Methods Mol Biol*. 2015; 1249: 3–26.
- Chen Z, Schiffman M, Herrero R, De Salle R, Anastos K, Segondy M, et al. Evolution and taxonomic classification of human papillomavirus 16 (HPV16)-related variant genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. *PLoS One*. 2011; 6(5): e20183.
- Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Muñoz N, Villa LL. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine*. 2006;24:S26–34.
- Clifford GM, Vuyst H De, Tenet V, Plummer M, Tully S, Franceschi S. Effect of HIV Infection on Human Papillomavirus Types Causing Invasive Cervical Cancer in Africa. 2016;73(3):332–9.

- Coghill AE, Shiels MS, Suneja G, Engels EA. Elevated Cancer-Specific Mortality Among HIV-Infected Patients in the United States. *J Clin Oncol*. 2015 Jul 20;33(21):2376-83.
- Cruz MR, Cerqueira DM, Cruz WB, Camara GNL, Brígido MM, Silva EO, et al. Prevalence of human papillomavirus type 16 variants in the Federal District, Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2004;99(3):281–2.
- Eide ML, Debaque H. HPV detection methods and genotyping techniques in screening for cervical cancer. *Ann Pathol* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2012 Dec [cited 2013 Jan 2];32(6):e15-23.
- Estrade C, Menoud PA, Nardelli-Haeffliger D, Sahli R. Validation of a low-cost human papillomavirus genotyping assay based on PGMYP-PCR and reverse blotting hybridization with reusable membranes. *J Clin Microbiol*. 2011; 49: 3474–81.
- FDA. Food and Drug Administration. Highlights of prescribing information. Gardasil 9 (Human Papillomavirus 9-valent Vaccine, Recombinant). Silver Spring, 2014a. [cited 2020 Dec 17]. Available from: <<https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/UCM426457.pdf>>
- Freitas LB, Chen Z, Muqui EF, Boldrini NAT, Miranda AE, Spano LC, et al. Human papillomavirus 16 non-European variants are preferentially associated with high-grade cervical lesions. *PLoS One*. 2014; 9:
- Frisch M, Biggar RJ, Goedert JJ. Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(18):1500–10.
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol*. 2010; 27(2): 221–4.
- Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Hildesheim A, Schiffman MH, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 357–61.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*. 1999; 41: 95–8.
- Heideman D.A. et al. Clinical validation of the cobas 4800 HPV test for cervical screening purposes. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011, 49: 3983-3985.
- Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol*. 1993; 67: 6413–23.
- Huang SZ, Sheng M, Zhao JQ, Qiu XK, Zeng YT, Wang QS, et al. Detection of sickle cell gene by analysis of amplified DNA sequences. *Yi Chuan Xue Bao*. 1989; 16(6): 475–82. PMID: 2640144
- Levi JE, Fernandes S, Tateno AF, Motta E, Lima LP, Eluf-Neto J, Pannuti CS. 2004. Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. *Gynecol Oncol* 92:225–231.
- Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJF, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer*. 2011; 128(4):927–35.

- Martins AES, Lucena-Silva N, Garcia RG, Welkovic S, Barboza A, Menezes MLB, et al. Prevalence of human papillomavirus infection, distribution of viral types and risk factors in cervical samples from human immunodeficiency virus-positive women attending three human immunodeficiency virus-acquired immune deficiency syndrome reference centres in northeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(6):738–47.
- Mattos AT, de Freitas LB, Lima BM, Miranda AE, Spano LC. Diversity and uncommon HPV types in HIV seropositive and seronegative women attending an STI clinic. *Braz J Microbiol*. 2011 Apr;42(2):786-93.
- Melgaço FG, Rosa MLG, Augusto EF, Haimuri JGS, Jacintho C, Santos LS, et al. Human papillomavirus genotypes distribution in cervical samples from women living with human immunodeficiency virus. *Arch Gynecol Obstet*. 2011;283(4):809–17.
- Miranda AE, Silveira MF, Travassos AG, Tenório T, do Val ICC, de Lannoy L, et al. High-risk Papillomavirus infection among Women living with Human Immunodeficiency Virus: Brazilian multicentric study. *J Med Virol*. 2017:1–18.
- Muñoz N, Castellsague X, de Gonza lez AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006; 24: 1–10.
- Oliveira PM, Oliveira RPC, Travessa IEM, et al (2010) Prevalence and risk factors for cervical intraepithelial neoplasia in HIV-infected women in Salvador, Bahia, Brazil. *Sao Paulo Med J*, 128, 197-201.
- Queiroz C, Travassos AG, Studart E, Araújo Filho JB, Sarno CK, Pinheiro CC. Prevalence of human Papilloma Virus in HIV-positive and HIV-negative patients in the State of Bahia: a pilot study . *Braz J Infect Dis*. 2004 Oct;8(5):356-62.
- Rocha-Brischiliari SC, Gimenes F, de Abreu ALP, Irie MMT, Souza RP, Santana RG, et al. Risk factors for cervical HPV infection and genotypes distribution in HIV-infected South Brazilian women. *Infect Agent Cancer*. 2014;9(1):6.
- Sichero L, Ferreira S, Trottier H, Duarte-Franco E, Ferenczy A, Franco EL, et al. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *Int J Cancer*. 2007; 120: 1763–8. <https://doi.org/10.1002/ijc.22481> PMID: 17230525
- Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T, Young N. The 2001 Bethesda System: Terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. 2002 Apr 24;287(16):2114-9.
- Strickler HD, Burk RD, Fazzari M, Anastos K, Minkoff H, Massad LS, et al. Natural history and possible reactivation of human papillomavirus in human immunodeficiency virus-positive women. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(8):577–86.
- Tamegão-Lopes B, Sousa-Júnior E, Passetti F, Ferreira C, de Mello W, Duarte Silvestre R. Prevalence of human papillomavirus infection and phylogenetic analysis of HPV-16 E6 variants among infected women from Northern Brazil. *Infect Agent Cancer*. 2014;9(1):25.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013; 30(12): 2725–9.
- Teixeira MF, Sabidó M, Leturiondo AL, de Oliveira Ferreira C, Torres KL, Benzaken AS. High risk human papillomavirus prevalence and genotype distribution among women infected with HIV in Manaus, Amazonas. *Virol J*. 2018 Feb 17;15(1):36.
- Villa, Luisa Lina. Prophylactic HPV vaccines: reducing the burden of HPV-related diseases. *Vaccine*. 2006: S23-S28

Volpini LPB, Boldrini NAT, de Freitas LB, Miranda AE, Spano LC. The high prevalence of HPV and HPV16 European variants in cervical and anal samples of HIV- seropositive women with normal Pap test results. *PLoS One* 2017; 12:e0176422.

Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart AC, Hildesheim A, Jenison SA. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol*. 1995; 69: 7743–53.

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

6.2.2 Resultados referentes à carga viral e quantificação dos transcritos do oncogene E7 em indivíduos HIV-positivos e mulheres HIV-negativas

Alta carga viral de HPV 16 e 31 correlacionada com lesão anogenital em indivíduos HIV-positivos e negativos

Lays Paula Bondi Volpini^{1*}, Luciana Bueno de Freitas², Silvia Almeida³, Jayme Combadão³, Neide Aparecida Tosato Boldrini⁴, Angelica Espinosa Miranda^{1,5}, Liliana Cruz Spano^{1,6}

¹Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil.

²Faculdade Multivix, Vitória, Brasil.

³Charles River Laboratories, Wilmington, Massachusetts, EUA.

⁴Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil.

⁵Departamento de Medicina Social, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil.

⁶Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil.

*Autor correspondente:

E-mail: layspaula90@gmail.com

RESUMO

A infecção com genótipos de alto risco do papilomavírus humano (HR-HPV) é o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer do colo do útero (CCU) e do câncer anal (CA) e o uso de biomarcadores, como carga viral e expressão de oncogenes virais, seria útil para orientar futuros algoritmos de rastreamento. O objetivo deste estudo foi avaliar se a carga viral e a expressão de mRNA E7 dos HR-HPV relacionados à vacina nonavalente (9vHPV) poderiam ser utilizados como biomarcadores para lesões cervicais e anais em indivíduos HIV-positivos e negativos. Trata-se de um estudo descritivo, em corte transversal, realizado com amostras cervicais e anais, previamente positivas para os HR-HPV correspondentes à 9vHPV, de indivíduos HIV-positivos e negativos. O DNA viral foi amplificado por PCR, o genótipo foi identificado por *Reverse Line Blot* (RLB) e *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). PCR em tempo real foi utilizada para determinar a carga viral e mRNA E7. Em geral, a mediana da carga viral dos HR-HPV dos indivíduos positivos e negativos para HIV, foi maior nos casos de lesão do que em citologia normal ($p= 0,003$ e $p=0,02$, respectivamente), aumentando de normal para ASCUS/LSIL e HSIL. Nas mulheres HIV-negativas, houve um aumento estatisticamente significativo da carga viral nos casos de lesão das amostras cervicais positivas para HPV16 ($p= 0,003$). Nos indivíduos HIV positivos, houve um aumento da carga viral nos casos de lesão e positivas para HPV31, tanto em amostras cervicais quanto anais ($p= 0,04$ e $p= 0,02$, respectivamente). Por fim, a mediana de mRNA E7 aumentou de normal para ASCUS+LSIL e HSIL ($p= 0,02$) e houve correlação moderada e positiva com o aumento da carga viral e a detecção de mRNA ($r= 0,61$; $p< 0,001$). Em conclusão, nosso estudo revelou diferenças significativas na carga viral, especialmente para HPV16 e 31, em indivíduos HIV-positivos e negativos, e demonstrou o uso potencial de carga viral e mRNA para diferenciar entre achados citológicos normais e anormais.

Palavras-chave: HPV. HIV. Carga viral. mRNA

INTRODUÇÃO

A infecção persistente com papilomavírus humano de alto risco (HR-HPV) tem um papel reconhecido na carcinogênese do câncer do colo do útero (CCU) e anal (CA) (Bosch et al., 1995; Zur Hausen et al., 2000). Algumas populações, particularmente aquelas com infecção pelo HIV, estão em maior risco de desenvolver esses tipos de cânceres em comparação aos indivíduos não infectados pelo HIV (Silverberg et al., 2012; Palefsky, 2017).

O CCU é o terceiro câncer mais comum entre as mulheres no mundo, com 569.847 novos casos e 311.365 óbitos ocorrendo em 2018 (Bruni et al., 2019). Por outro lado, o CA é raro na população geral (1/100.000), com uma estimativa anual de 27.000 novos casos. No entanto, ocorre uma incidência elevada entre homens que fazem sexo com homens (MSM), mulheres com histórico de CCU ou câncer de vulvar, e populações imunossuprimidas (Bruni et al., 2019).

A prevenção primária do CCU baseia-se em três vacinas disponíveis atualmente: a vacina bivalente (2vHPV 16/18), a quadrivalente (4vHPV- 6/11/16/18), e a nonavalente (9vHPV- 6/11/16/18/31/33/45/52/58). Para prevenção secundária, o rastreamento de lesões precursoras baseado em citologia (exame de Papanicolau) é a modalidade mais utilizada para o rastreamento do CCU em todo o mundo. No entanto, sua baixa sensibilidade requer repetições em intervalos curtos de tempo (Wentzensen et al., 2016). Em relação ao CA, não existem diretrizes ou ensaios clínicos randomizados para fornecer o rastreamento adequado ou recomendações baseadas em evidências (Wells et al., 2014).

O teste de HR-HPV tem alta sensibilidade e atualmente é recomendado em alguns países desenvolvidos para o rastreamento do CCU como triagem ou junto com a citologia (co-teste), permitindo intervalos mais longos, devido ao maior valor preditivo negativo do que a citologia (Arbyn et al., 2012; Ronco et al., 2014; Wentzensen et al., 2016). Apesar da alta sensibilidade, o teste de HPV não discrimina infecções ativas, ou transitórias (Ho et al., 2010), e, portanto, é

imprescindível a identificação de marcadores que possam indicar quais infecções pelo HPV resultarão em progressão para o câncer. Nesse contexto, potenciais biomarcadores surgiram para melhorar a sensibilidade da detecção de lesões de alto grau (HSIL) (Tornesello et al., 2013). Esses biomarcadores podem ser divididos em marcadores celulares, incluindo a expressão p16INK4a (p16) e Ki67, e marcadores virais, incluindo carga viral, expressão de mRNA E6/E7, integração e metilação do genoma HPV (Tornesello et al., 2013).

Diferenças na carga viral podem ser observadas entre citologia normal e lesão e entre os tipos de HPV, indicando que níveis variáveis de replicação viral podem ser necessários para levar à lesão cervical (Flores et al., 2006; Xi et al., 2017). A expressão contínua dos oncogenes *E6* e *E7* de HR-HPV alteram a regulação do ciclo celular e é necessária para o desenvolvimento do fenótipo neoplásico (Johansson et al., 2015). Neste contexto, estudos tem associado o aumento da carga viral do HPV e de mRNA E6/E7 com desenvolvimento de lesões cervicais e anais (Flores et al., 2006; Marongiu et al., 2014; Dong et al., 2017; Jin et al., 2017; Marra et al., 2018; Adcock et al., 2019, Ho et al., 2010; Jin et al., 2017; Wu et al., 2018).

Baseado no entendimento de que o papel dos biomarcadores no desenvolvimento de lesões cervicais e anais pode ser útil para orientar futuros algoritmos para o rastreamento do câncer, foi avaliado se a carga viral e o mRNA E7 dos HR-HPV correspondentes à vacina 9vHPV podem ser utilizados como biomarcadores para lesões cervicais e anais em indivíduos HIV-positivos e negativos.

MÉTODOS

Pacientes, amostras e aspectos éticos

Trata-se de um estudo descritivo, em corte transversal, realizado amostras positivas para HR-HPV correspondentes à 9vHPV, de indivíduos positivos e negativos para HIV. As amostras foram obtidas a partir dos seguintes estudos: (i) 172 amostras cervicais de mulheres HIV-positivas atendidas em Centros de Referência em DST/AIDS (CRDST/AIDS) de oito estados brasileiros (Amazonas, Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul) de março a dezembro de 2015; (ii) 70 amostras anais de mulheres e homens HIV-positivos atendidos no CRDST/AIDS de Vitória, ES, de agosto de 2013 a dezembro de 2015; e (iii) 65 amostras cervicais de mulheres HIV-negativas atendidas no Hospital Universitário "Cassiano Antonio Moraes" (HUCAM), de abril de 2010 a novembro de 2011, em Vitória, ES. As condições de coleta das amostras, caracterização do HPV e informações sobre dados clínicos, comportamentais e demográficos dos sujeitos foram descritas anteriormente (Freitas et al., 2014; Boldrini et al., 2018; Miranda et al., 2018). Todas as amostras foram mantidas -70°C até as análises atuais. Os achados citológicos foram interpretados de acordo com os critérios definidos no sistema Bethesda (Solomon et al., 2002).

Esta pesquisa obteve aprovação do Conselho de Pesquisa Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (n° 2.925.324).

Análise da carga viral do HPV

A carga viral dos HR-HPV correspondentes à 9vHPV (16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58) foi determinada por PCR em tempo real. Foram utilizados iniciadores e sondas para os genes *E6* e *E7* para HPV16 e HPV18, respectivamente, e *E7* para HPV31, 33, 45, 52 e 58 (Gravitt et al., 2003; Winer et al., 2014). O ensaio para o HPV16 e 18 foi realizado de acordo com Gravitt et

al. (2003) com modificações. Resumidamente, três µl de DNA extraído foram adicionados a sete µL de mistura contendo 1X Buffer (200 mM Tris HCl e 500 mM KCl), 20 mM de cada dATP, dGTP, dCTP e dTTP, 0,1 µM de sonda de hidrólise, 0,2 µM de cada iniciador, 0,6 mM de MgCl₂, 0,12 µM de CXR (Promega Madison, WI, EUA) e 1 Unidade DNA Taq Polimerase Platinum (Invitrogen Carlsbad, CA, EUA). As condições de ciclagem foram descritas anteriormente (Gravit et al., 2003). O ensaio para o HPV 31, 33, 45, 52 e 58 foi realizado utilizando 1x TaqMan® PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), como descrito anteriormente (Winer et al., 2014).

A carga viral foi normalizada utilizando o gene *β-globina* com iniciadores descritos por Huang et al. (1989). A sonda de hidrólise foi desenhada para abranger a região entre os primers usando Primer3 v.0.4.0. A reação foi realizada utilizando TaqMan® PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Todos os ensaios de amplificação foram realizados em equipamentos StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

As curvas padrão para quantificação absoluta dos tipos de HPV e *β-globina* foram geradas por meio de diluições seriadas de 1:10 (10⁶-10¹ cópias do genoma) com fragmentos de oligonucleotídeos sintéticos *gBlock* de 150 bp (Thermo Fisher), desenhados a partir de sequências de referência de genótipos HPV e *β-globina* abrangendo a região entre os iniciadores (GenBank ID: HPV16 - K02718, HPV18 - X05015, HPV31 - J04353, HPV33 - M12732, HPV45 - X74479, HPV 52 - X74481, HPV58 - D90400, *β-globina* - NC_000011,10).

A carga viral, expressa em cópias por célula (c/c) foi obtida dividindo o número de cópias do HPV pela metade do número de cópias de *β-globina*, e foi categorizado como baixa (<10 c/c), moderada (11-100 c/c), alta (101-1.000 c/c) ou muito alta (>1.000 c/c) (Schlecht et al., 2003). A carga viral do HPV foi transformada em log (log₁₀) para representação gráfica.

Quantificação de mRNA E7

Para a quantificar o mRNA E7, o ensaio de carga viral foi adaptado adicionando uma etapa de digestão com DNase e uma transcrição reversa, uma vez que os genes *E6* e *E7* são transcritos a partir do mesmo promotor como um único pré-RNA E6/E7 (Zheng e Baker 2006; Wang et al. 2011). Iniciadores e sondas para todos os HR-HPV foram usados conforme descrito por Winer et al. (2014).

Resumidamente, o RNA total de amostras positivas para os HR-HPV 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58 foi extraído utilizando o PureLink[®] Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen Carlsbad, CA, EUA). A concentração de RNA total extraído foi determinada usando Qubit 4 Fluorometer[®] (Invitrogen Carlsbad, CA, EUA). Para eliminar o DNA da amostra, o RNA total foi tratado com DNase livre de RNase utilizando o Kit DNase Max (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, cinco μL do RNA tratado foi desnaturado com um μL de dimetil sulfoxido (DMSO - Sigma) a 97°C por 7 min e refrigerado a 4°C. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado em um volume final de 25 μL contendo 60 unidades de transcriptase reversa Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 20 mM de Random Hexamers primers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 3 mM MgCl_2 , 200 μM de cada dNTP e tampão de reação (20 mM tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl). A mistura foi incubada a 44°C por 60 min, seguida por 95°C por 10 min.

A reação de PCR para cada genótipo de HPV foi realizada com três μL do cDNA adicionado a sete μL da mistura de reação para PCR, conforme descrito por Winer et al. (2014) A curva padrão para cada genótipo HPV foi construída utilizando fragmentos sintéticos como descrito para determinação de carga viral.

A detecção do gene *GAPDH* humano (VANDESOMPELE et al., 2002) foi realizada como controle da suficiência da amostra. Além disso, qPCR foi realizada em amostras tratadas com DNase para verificar se não havia DNA remanescente. A detecção do cDNA foi aceita

apenas se não houvesse detecção na amostra correspondente tratada com DNase ou se houvesse detecção com um valor de CT acima de 10 ciclos do valor de CT para o cDNA (Anderson et al. 2011). A quantidade de transcrito foi expressa como cópias de mRNA E7 por ng de RNA total.

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). Os grupos foram comparados com o teste Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher para características qualitativas e os testes de Mann-Whitney e Kruskal Wallis para as contínuas. A relação entre a carga viral e mRNA foi avaliada utilizando o coeficiente de correlação de *Pearson*. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Neste estudo, foram analisadas 248 amostras (113 amostras cervicais de mulheres HIV-positivas, 70 amostras anais de homens e mulheres HIV-positivos e 65 amostras cervicais de mulheres HIV-negativas). As características de cada população estudada são apresentadas na Tabela 1. Das amostras anais, 37,1% (26/70) eram de homens que fazem sexo com homens e 62,9% (44/70) eram de mulheres.

Tabela 1. Número de amostras, infecção múltipla e achados citológicos de cada população estudada.

Características	HIV-positivos ^a		HIV negativas ^a
	Cervical	Anal	
Nº de amostras	113	70	65
Infecção múltipla	69 (61,1)	57 (81,4)	28 (43,1)
HPV			
16	40 (35,4)	36 (51,4)	27 (41,5)
18	19 (16,8)	15 (21,4)	9 (13,8)
31	22 (19,5)	10 (14,3)	9 (13,8)
33	8 (7,1)	6 (8,6)	4 (6,2)
45	15 (13,3)	14 (20,0)	2 (3,1)
52	23 (20,4)	16 (22,8)	11 (16,9)
58	14 (15,0)	10 (14,3)	9 (16,8)
Citologia			
Normal	87 (77)	47 (67,1)	17 (26,2)
ASCUS/LSIL	19 (16,8)	22 (31,4)	16 (24,6)
HSIL	7 (6,2)	1 (1,4)	32 (49,2)

^aOs valores de porcentagem estão entre parênteses; ^bASCUS, células escamosas atípicas com significado indeterminado; LSIL, lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; HSIL, lesão intraepitelial escamosa de alto grau.

Em geral, a mediana da carga viral de cada HR-HPV das amostras cervicais e anais foi maior nos casos de lesão (\geq ASCUS) do que em citologia normal, tanto de indivíduos HIV-positivos como em negativos, ($p= 0,003$ e $p= 0,02$, respectivamente) (Tabela 2).

Nas mulheres HIV-negativas, independente do tipo, baixa carga viral foi observada em citologia normal (0,68 c/c), e ASCUS/LSIL (7,32 c/c) e carga viral moderada em HSIL (10,28 c/c) ($p= 0,01$). Além disso, houve aumento estatisticamente significativo da carga viral nos casos de lesão nas amostras positivas para HPV16 (Tabela 2; Figura 1A). Esse aumento foi de 0,17 c/c em citologia normal para 30,66 c/c em ASCUS/LSIL e 10,99 c/c em HSIL ($p= 0,003$).

Nos indivíduos HIV-positivos, independente do tipo de HPV ou local anatômico de coleta, foi observada carga viral moderada em citologia normal e ASCUS/LSIL (20,19 e 59,91 c/c, respectivamente), aumentando para alta carga viral em HSIL (133,21 c/c) ($p=0,01$). Além disso, houve aumento estatisticamente significativo da carga viral nos casos de lesão (\geq ASCUS) nas amostras positivas para HPV31, em amostras cervicais e anais (Tabela 2; Figura 1B e Figura 1C, respectivamente). Por outro lado, a mediana da carga viral do HPV52 e 58 foi ligeiramente menor nos casos de lesão cervical do que nos casos de citologia normal, mas sem significância estatística (Tabela 2; Figura 1C).

Independentemente da positividade para HIV, a análise da infecção única ou múltipla não mostrou diferença estatística entre cargas virais de citologia normal, ASCUS/LSIL e HSIL (dados não apresentados).

Tabela 2. Carga viral (cópias/células) dos HR-HPV de acordo com a presença ou ausência de lesão cervical e anal em indivíduos HIV positivos e negativos

^aValor referente à amostra com lesão; ^bValor médio das duas amostras com lesão; ^cEstatisticamente significativo ($p < 0,05$).

HPV	HIV-negativo				p	HIV-Positivo (cervical)				p	HIV-positivo (anal)				p
	Normal		Lesão			Normal		Lesão			Normal		Lesão		
	n	Mediana	n	Mediana		N	Mediana	n	Mediana		n	Mediana	n	Mediana	
16	5	0,17	22	13,74	< 0,001 ^c	31	11,06	9	19,78	0,57	24	20,06	12	59,29	0,45
18	4	2,65	5	3,62	0,55	15	5,87	4	30,88	1,0	14	15,24	1	2094,99 ^a	-
31	2	31,8 ^b	7	4,58	-	15	13,31	7	2936,28	0,04 ^c	6	96,34	4	3716,15	0,02 ^c
33	-	-	4	168,96	-	7	31,77	1	0,84 ^a	-	4	663,26	2	747,95 ^b	-
45	-	-	2	2,91 ^b	-	13	15,9	2	14,82 ^b	-	9	4,78	5	15,06	0,43
52	5	1,57	6	5,14	0,66	18	295,8	5	309,84	0,43	7	33,47	9	30,64	0,53
58	1	0,66 ^a	8	8,17	-	10	65,0	4	78,06	1,0	5	2,92	5	1,21	1,00
Total	17	0,68	54	9,24	0,003 ^c	109	22,5	32	83,86	0,06	69	16,67	38	62,01	0,13

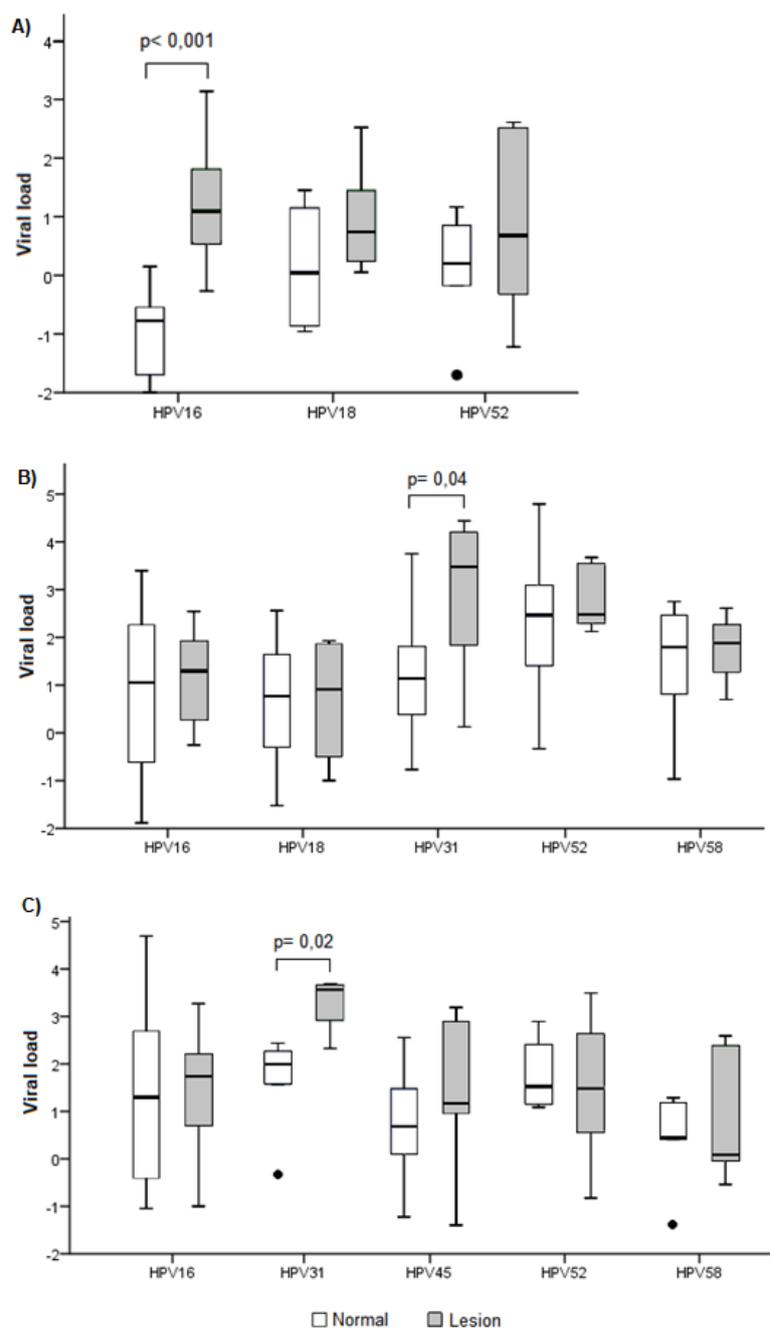


Figura 1. Representação em boxplot da carga viral, em escala logarítmica, distribuída entre casos normais e lesões. Os limites superior e inferior das caixas representam os percentis 75% e 25%, respectivamente. A linha dentro da caixa representa a mediana e os *whiskers* representam os valores mínimo e máximo. Não foi possível calcular a mediana dos tipos não apresentados devido à falta de número de amostras positivas para esses tipos. A) Carga viral dos HPV16, 18 e 52 em amostras cervicais de mulheres HIV-negativas. B) Carga viral dos HPV 16, 18, 31, 52 e 58 em amostras cervicais de mulheres HIV-positivas. C) Carga viral dos HPV16, 31, 45, 52 e 58 em amostras anais de homens e mulheres HIV-positivos.

As medianas de mRNA E7 de cada HR-HPV relacionado à amplificação de *GAPDH* são apresentadas na Tabela 3. Devido ao pequeno número de amostras, analisamos todos os tipos de HR-HPV, independentemente do *status* de HIV ou tipo de HPV, e observamos que houve um aumento da mediana do mRNA de normal para ASCUS + LSIL e HSIL (2,12, 7,72, 13,57 cópias/ng de RNA, respectivamente; $p=0,02$). Além disso, houve correlação moderada e positiva do aumento da carga viral com o aumento de mRNA ($r=0,61$; $p<0,001$) (Figura 2).

Tabela 3. Frequência de detecção e mediana de mRNA (cópias/ng de RNA) de acordo com os achados citológicos de indivíduos HIV-positivos e negativos.

HPV	HIV positivo					HIV negativo				
	Normal		Lesão		p	Normal		Lesão		p
	n	Mediana	n	Mediana		n	Mediana	n	Mediana	
16	16	5,82	4	10,54	0,29	3	1,91	5	19,97	0,25
18	3	0,34	0	-	-	0	-	0	-	-
31	1	1,33	6	20,03	-	0	-	1	171,92	-
33	4	6,87	1	7,66	-	0	-	1	15,59	-
45	8	0,08	1	0,74	-	0	-	0	-	-
52	12	2,11	6	4,67	0,62	1	10,37	1	6,01	-
58	3	0,20	3	0,11	1,0	1	0,02	1	0,19	-
Total	47	2,34	21	7,67	0,16	5	1,91	9	15,59	0,08

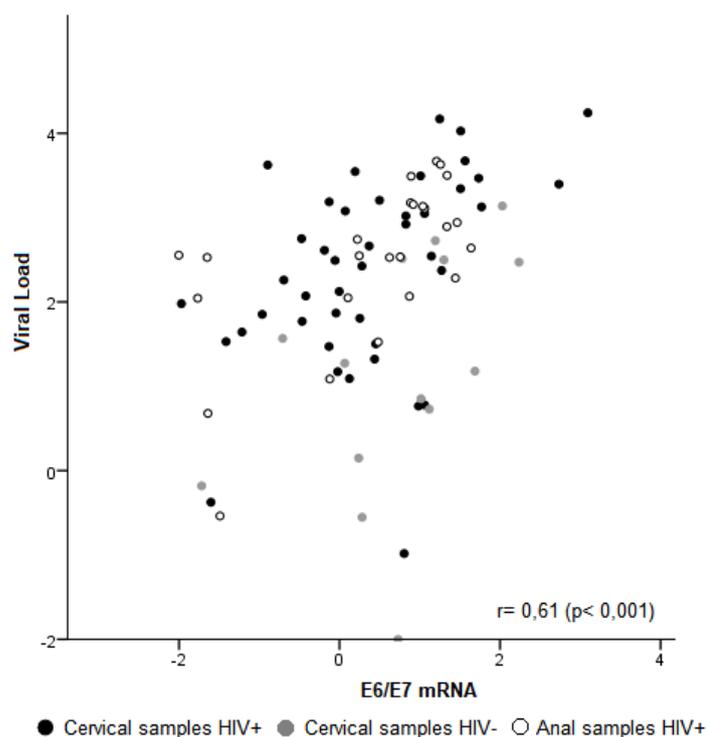


Figura 2 - Correlação entre carga viral e mRNA E7.

DISCUSSÃO

Biomarcadores para detecção de HSIL podem ser utilizados para melhorar a sensibilidade da citologia cervical. Por outro lado, poucos estudos descreveram o uso de biomarcadores no rastreamento do CA. Neste estudo, investigamos a carga viral e quantificação de mRNA E7, potenciais biomarcadores, de HR-HPV correspondentes à vacina 9vHPV de amostras cervicais e anais de indivíduos HIV-positivos e amostras cervicais de mulheres HIV-negativas. Até o momento, este é o primeiro estudo a relatar carga viral e mRNA de todos os HR-HPV incluídos na vacina 9vHPV nessas populações, concomitantemente.

A mediana da carga viral dos HR-HPV pesquisados foi maior nos casos de lesão do que em citologia normal em ambas as amostras cervicais e anais, com significância estatística em amostras cervicais de mulheres HIV-negativas. É importante mencionar que a maioria estudos avaliaram a carga viral do HPV16 e demonstraram um aumento associado à lesão cervical

(Saunier et al., 2008; Hesselink et al., 2009; Xi et al., 2011; Álvarez-Paredes et al., 2019). No entanto, estudos com outros genótipos de HR-HPV em amostras cervicais e anais são escassos e inconsistentes na literatura, especialmente para indivíduos HIV-positivos (Flores et al., 2006; Marongiu et al., 2014; Ramanakumar et al., 2010; Del Rio-Ospina et al., 2015; Jin et al., 2017; Xi et al., 2017; Mbulawa et al., 2014; Utaipat et al., 2016).

Nas amostras positivas para HPV16, a mediana da carga viral foi maior nos casos de lesão cervical de mulheres HIV-negativas (carga viral moderada) do que em citologia normal (carga viral baixa). Além disso, observamos aumento da carga viral em lesão de baixo grau (ASCUS/LSIL) e declínio em HSIL conforme observado por outros estudos (Tsai et al., 2005; Briolat et al., 2007; Manawapat-Klopper et al., 2018). Este fato pode ser explicado por altos níveis de replicação viral no início desenvolvimento de lesões (Briolat et al., 2007). Mesmo após altas cargas virais iniciais, a integração do DNA do HPV no genoma do hospedeiro, observada principalmente em HSIL, pode levar a uma diminuição na replicação viral e na carga viral (Kulmala et al., 2005).

Em mulheres HIV-positivas, a mediana da carga viral das amostras cervicais com algum grau de lesão foi maior do que em resultados citológicos normais, sendo estatisticamente significativa para HPV31 ($p=0,04$), bem como em amostras anais de mulheres e HSH HIV-positivos ($p=0,02$). Além disso, observamos maior mediana de carga viral em indivíduos HIV-positivos do que em mulheres HIV-negativas, tanto na citologia normal quanto em lesão. É reconhecido que existem diferenças na prevalência, incidência e progressão da doença relacionada ao HPV em indivíduos HIV-positivos quando comparados com indivíduos HIV-negativos (McKenzie et al., 2010). Estudos têm mostrado que indivíduos HIV-positivos são mais comumente infectados com HR-HPV não 16 e 18 (Levi et al., 2004; Luque et al., 2006; McKenzie et al., 2010), e a mediana da carga viral de HR-HPV em mulheres HIV-positivas é maior do que em HIV-negativas, independentemente do tipo de HPV (Mbulawa et al., 2014).

Portanto, carga viral elevada e significativa de HPV31 observada em indivíduos HIV-positivos poderia ser um reflexo da suscetibilidade destes à infecção por outros HR-HPV diferentes de HPV16 e 18.

Em geral, identificamos o aumento da carga viral do HPV16 e 31 em lesão cervical e anal de HIV-negativos e positivos, respectivamente. Nossos resultados apontam sobre a importância de identificar mulheres com maior risco de HSIL com base na carga viral, de acordo com o genótipo HPV e a população estudada. Segundo Adcock e colaboradores (2019), os HPV16, 33 e 31 são os genótipos com maior risco de doença pré-cancerosa e o risco de NIC2+ foi acima de 10% para infecções com alta carga viral nestes tipos. Portanto, a genotipagem e a carga viral podem ajudar a desenvolver algoritmos para melhorar o manejo clínico de indivíduos HPV positivos, principalmente para indivíduos HIV-positivos, população especialmente em risco para desenvolver câncer anogenital, e que exibam níveis mais elevados de carga viral do que em HIV-negativos.

Para determinar a quantidade de mRNA E7, adaptamos o ensaio de carga viral adicionando uma etapa de digestão com DNase e uma etapa de transcrição reversa. Os genes *E6* e *E7* são transcritos a partir do mesmo promotor como um único pré-RNA E6/E7 bicistrônico (Zheng e Baker 2006; Wang et al., 2011). A ORF E6 neste pré-mRNA bicistrônico contém um *intron* sujeito a *splicing* alternativo. Em seguida, verificamos se os iniciadores e sondas usados para cada genótipo de HPV no ensaio de carga viral estariam em uma região intrônica. Com exceção dos iniciadores e sondas usados para HPV16, todos os outros tinham como alvo uma região do gene *E7*, que não sofre *splicing*. Assim, para HPV16, iniciadores e sondas foram usados conforme descrito por Winer et al. (2014).

Estudos mostram que a detecção de transcritos de mRNA E7 está relacionada à presença de HSIL cervical, sendo considerada um potencial biomarcador de lesão cervical e câncer (Derbie et al., 2020; Macedo et al., 2019). A maioria dos estudos tem avaliado apenas a detecção

de mRNA E6 ou E7 e poucos estudos propuseram quantificar esses transcritos (Wang-Johanning et al., 2002; Scheurer et al., 2005; 2007; Ho et al., 2010; Bordigoni et al., 2021). Comparado aos métodos de detecção, o uso de PCR em tempo real para a quantificação permite uma comparação direta do número de cópias de mRNA E6/E7 em cada amostra por meio da construção de curva-padrão em cada ensaio, permitindo estabelecer um *cut-off* em cada achado citológico, por exemplo.

Verificamos que, independentemente do *status* para HIV ou tipo de HPV, houve aumento da mediana de mRNA de normal para ASCUS+LSIL e HSIL ($p = 0,02$). Além disso, encontramos correlação moderada e positiva com o aumento da carga viral e a quantificação do mRNA ($r = 0,61$; $p < 0,001$) semelhantes aos resultados de Baron et al. (2015), que demonstraram que o mRNA E6/E7 é mais frequentemente detectado em amostras com maior carga viral. Ho e colaboradores descreveram o aumento da média geométrica de mRNA E6 de HPV16, 18, 52 e 58 de normal e NIC1 para NIC2 e NIC3. Poucos estudos avaliaram a detecção de mRNA em amostras anais, porém, a maioria deles observou um aumento da frequência de detecção de mRNA com o aumento do grau de lesão anal (Phanuphak et al., 2013; Wentzensen et al., 2014, Jin et al., 2017). Assim, os biomarcadores avaliados para o rastreamento do CCU também podem ser usados no rastreamento do CA, uma vez que as características moleculares da doença anal são semelhantes às das lesões cervicais, como demonstrado anteriormente (Wentzensen et al., 2014).

Reconhecemos que nosso estudo teve limitações. Em primeiro lugar, determinar a carga viral é um desafio, uma vez que há uma falta de homogeneidade nas medições entre os estudos em que a carga viral pode ser representada como cópias/células ou cópias/ng de DNA (Wu et al., 2017), dificultando a análise dos resultados. Em nosso estudo, usamos a *β -globina* para normalizar a carga viral como cópias/células, minimizando os impactos dos fatores de confusão da variação do volume da amostra. Segundo, devido ao pequeno tamanho da amostra, o poder

e as análises estatísticas de nosso estudo foram limitados. Além disso, não foi possível analisar o HPV em infecção simples, para reduzir possível viés de medida da carga viral, devido ao tamanho limitado da amostra. No entanto, em um estudo recente, Adcock e colaboradores (2019) demonstraram que não há risco adicional associado a coinfeções para o desenvolvimento de HSIL. Finalmente, a detecção de mRNA em nossas amostras pode ter sido comprometida devido ao tempo entre a coleta e as análises.

Apesar das limitações mencionadas, nossos resultados fornecem informações valiosas sobre a carga viral do HPV e quantificação do mRNA como potenciais biomarcadores de lesão anogenital. Considerando a baixa sensibilidade da citologia, os testes de carga viral e mRNA do HPV poderiam ser promissores para o rastreamento do câncer, melhorando a especificidade e a possibilidade de realizar os testes com apenas uma amostra. Além disso, demonstramos comportamento diferente da carga viral do HPV em indivíduos HIV-positivos e negativos. Portanto, algoritmos baseados no genótipo do HPV e carga viral poderiam ser úteis para identificar os indivíduos com maior risco de desenvolver lesões anogenitais, aumentando o intervalo de triagem, reduzindo o número de mulheres atualmente recomendadas para colposcopia imediata (Adcock et al., 2019) e estabelecendo diretrizes para rastreamento do CA.

Em conclusão, nosso estudo revelou diferenças significativas na carga viral dos tipos de HR-HPV mais prevalentes, especialmente HPV16 e 31, em indivíduos HIV-positivos e negativos. Além disso, nossos resultados apoiam o uso potencial de carga viral e mRNA para diferenciar entre achados citológicos normais e anormais, levando a identificar os indivíduos HPV positivos com maior risco de desenvolver lesão anogenital.

REFERÊNCIAS

- Adcock R, Cuzick J, Hunt WC, McDonald RM, Wheeler CM, Wheeler CM. Role of HPV Genotype, Multiple Infections, and Viral Load on the Risk of High-Grade Cervical Neoplasia.. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2019 Nov;28(11):1816-1824.
- Álvarez-Paredes, L., Santibañez, M., Galiana, A., Díaz, J. C. R., Parás-Bravo, P., Andrada-Becerra, M. E., Paz-Zulueta, M. Association of human papillomavirus genotype 16 viral variant and viral load with cervical high-grade intraepithelial lesions. *Cancer Prevention Research.* 2019: 12(8), 547-556
- Andersson E, Kärberg C, Rådberg T, Blomqvist L, Zetterqvist BM, Ryd W, et al. Type-dependent E6/E7 mRNA expression of single and multiple high-risk human papillomavirus infections in cervical neoplasia. *J Clin Virol.* 2012;54(1):61–5.
- Arbyn M, Ronco G, Anttila A, Meijer CJ, Poljak M, Ogilvie G, et al. Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine.* 2012; 30(Suppl 5):F88–99.
- Baron C, Henry M, Tamalet C, Villeret J, Richet H, Carcopino X. Relationship between HPV 16, 18, 31, 33, 45 DNA detection and quantitation and E6/E7 mRNA detection among a series of cervical specimens with various degrees of histological lesions. *J Med Virol.* 2015 Aug;87(8):1389-96
- Boldrini NAT, Volpini LPB, De Freitas LB, Musso C, De Vargas PRM, Spano LC, et al. Anal HPV infection and correlates in HIV-Infected patients attending a sexually transmitted infection clinic in Brazil. *PLoS One.* 2018;13(7):1–14.
- Bordigoni, Alexia, et al. "Development and validation of a multiplex qPCR assay for detection and relative quantification of HPV16 and HPV18 E6 and E7 oncogenes. *Sci Rep.* 2021 Feb 17;11(1):4039
- Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:244-65.
- Briolat J, Dalstein V, Saunier M, Joseph K, Caudroy S, Pretet J-L, Birembaut P, Clavel C. HPV prevalence, viral load and physical state of HPV-16 in cervical smears of patients with different grades of CIN. *Int. J. Cancer* 2007; 121: 2198–2204.
- Bruni L, Albero G, Serrano B, Mena M, Gómez D, Muñoz J, et al. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report 17 June 2019 [cited 2020 Mar 9]. Available from: <https://www.hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>.
- Del Río-Ospina L, Soto-De León SC, Camargo M, Moreno-Pérez DA, Sánchez R, Pérez-Prados A, et al. The DNA load of six high-risk human papillomavirus types and its association with cervical lesions. *BMC Cancer* [Internet]. 2015;15(1):100.
- Derbie A, Mekonnen D, Woldeamanuel Y, Ostade X Van, Abebe T. HPV E6 / E7 mRNA test for the detection of high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2 +): a systematic review. *Infect Agent Cancer.* 2020 Feb 7;15:9
- Dong B, Sun P, Ruan G, Huang W, Mao X, Kang Y, Pan D, Lin F. Type-specific high-risk human papillomavirus viral load as a viable triage indicator for high-grade squamous intraepithelial lesion: a nested case- control study. *Cancer Manag Res.* 2018 Oct 23;10:4839-4851.

- Flores R, Papenfuss M, Klimecki WT, Giuliano AR. Cross-sectional analysis of oncogenic HPV viral load and cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 2006;118:1187–93
- Freitas LB, Chen Z, Muqui EF, Boldrini NAT, Miranda AE, Spano LC, et al. Human papillomavirus 16 non-European variants are preferentially associated with high-grade cervical lesions. *PLoS One*. 2014; 9:
- Gravitt PE, Peyton C, Wheeler C, Apple R, Higuchi R, Shah K V. Reproducibility of HPV 16 and HPV 18 viral load quantitation using TaqMan real-time PCR assays. *J Virol Methods*. 2003 Sep; 112(1-2):23-33
- Hesselink AT, Berkhof J, Heideman DA, Bulkman NW, van Tellingen JE, Meijer CJ, et al. High-risk human papillomavirus DNA load in a population-based cervical screening cohort in relation to the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Int J Cancer* 2009;124:381–6.
- Ho CM, Lee BH, Chang SF, Chien TY, Huang SH, Yan CC, et al. Type-specific human papillomavirus oncogene messenger RNA levels correlate with the severity of cervical neoplasia. *Int J Cancer*. 2010;127(3):622–32.
- Huang SZ, Sheng M, Zhao JQ, Qiu XK, Zeng YT, Wang QS, et al. Detection of sickle cell gene by analysis of amplified DNA sequences. *Yi Chuan Xue Bao*. 1989; 16(6): 475–82
- Jin F, Roberts JM, Grulich AE, Poynten IM, Machalek DA, Cornall A, et al. The performance of human papillomavirus biomarkers in predicting anal high-grade squamous intraepithelial lesions in gay and bisexual men. 2017;(January):1303–11.
- Kulmala, S.M.; Syrjanen, S.M.; Gyllensten, U.B.; Shabalova, I.P.; Petrovichev, N.; Tosi, P.; Syrjanen, K.J.; Johansson, B.C. Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J. Clin. Pathol*. 2006, 59, 513–517
- Levi E, Fernandes S, Tateno F, Motta E, Lima LP. Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. *Gynecologic Oncology* 2004;92:225–31.
- Luque AE, Jabeen M, Messing S, Lane CA, Demeter LM, Rose RC, et al. Prevalence of Human Papillomavirus Genotypes and Related Abnormalities of Cervical Cytological Results among HIV-1–Infected Women in Rochester, New York. *J Infect Dis* [Internet]. 2006;194(4):428–34.
- Macedo ACL, Gonçalves JCN, Bavaresco DV, Grande AJ, Silva NC, Rosa MI. Accuracy of mRNA HPV Tests for Triage of Precursor Lesions and Cervical Cancer : A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Oncol*. 2019 Jun 11;2019:6935030..
- Manawapat-klopfer A, Wang L, Haedicke-jarboui J, Stubenrauch F, Munk C. HPV16 viral load and physical state measurement as a potential immediate triage strategy for HR-HPV-infected women : a study in 644 women with single HPV16 infections. 2018;8(4):715–22.
- Marongiu L, Godi A, Parry J V, Beddows S. Human Papillomavirus 16, 18, 31 and 45 viral load, integration and methylation status stratified by cervical disease stage. *BMC Cancer*, 2014 30;14:384.
- Marra E, King A, Logchem E Van, Weele P Van Der, Mooij SH, Heijman T, et al. Anal HPV 16 and 18 viral load : A comparison between HIV-negative and -positive MSM and association with persistence. 2018;(April 2017):76–83.
- Mbulawa ZZ, Johnson LF, Marais DJ, Gustavsson I, Moodley JR, Coetzee D, et al. Increased alpha-9 human papillomavirus species viral load in human immunodeficiency virus positive women. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2014;14(1):51.

- McKenzie ND, Kobetz EN, Hnatyszyn J, Twiggs LB, Lucci J a. Women with HIV are more commonly infected with non-16 and -18 high-risk HPV types. *Gynecol Oncol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;116(3):572–7.
- Miranda AE, Silveira MF, Travassos AG, Tenório T, do Val ICC, de Lannoy L, et al. High-risk Papillomavirus infection among Women living with Human Immunodeficiency Virus: Brazilian multicentric study. *J Med Virol*. 2017:1–18.
- Palefsky JM. Human papillomavirus-associated anal and cervical cancers in HIV-infected individuals. *Curr Opin HIV AIDS*. 2017;12(1):26–30.
- Phanuphak N, Teeratakulpisarn N, Keelawat S, Pankam T, Barisri J, Triratanachat S, et al. Use of human papillomavirus DNA, E6/E7 mRNA, and p16 immunocytochemistry to detect and predict anal high-grade squamous intraepithelial lesions in HIV-positive and HIV-negative men who have sex with men. *PLoS One*. 2013;8(11).
- Ramanakumar A V, Goncalves O, Richardson H, Tellier P, Ferenczy A, Coutlée F, et al. Human papillomavirus (HPV) types 16, 18, 31, 45 DNA loads and HPV-16 integration in persistent and transient infections in young women. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2010;10(1):326
- Ronco G, Dillner J, Elfstrom KM, Tunesi S, Snijders PJ, Arbyn M, Kitchener H, Segnan N, Gilham C, Giorgi-Rossi P, Berkhof J, Peto J, Meijer CJ. International HPV screening working group (2014) Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet* 383: 524–532.
- Saunier M, Monnier-Benoit S, Mauny F, Dalstein V, Briolat J, Riethmuller D, et al. Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for identification of HPV16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma. *J Clin Microbiol*. 2008 Nov;46(11):3678-85.
- Scheurer ME. Correlation of Human Papillomavirus Type 16 and Human Papillomavirus Type 18 E7 Messenger RNA Levels with Degree of Cervical Dysplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2005;14(8):1948–52.
- Scheurer, Michael E., et al. Absolute quantitative real-time polymerase chain reaction for the measurement of human papillomavirus E7 mRNA in cervical cytobrush specimens. *Infect Agent Cancer*. 2007 Apr 2;2:8.
- Schlecht NF, Trevisan A, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, et al. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*. 2003; 103(4):519–24.
- Silverberg MJ et al. Risk of anal cancer in HIV-infected and HIV- uninfected individuals in North America. *Clin Infect Dis*. 2012;54(7):1026–34.
- Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T, Young N. 2002. The 2001 Bethesda System: Terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 287:2114–2119.
- Tornesello ML, Buonaguro L, Giorgi-Rossi P, Buonaguro FM. Viral and cellular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *Biomed Res Int*. 2013;2013:519619.
- Tsai HT, Wu CH, Lai HL, Li RN, Tung YC, Chuang HY, et al. Association between quantitative high-risk human papillomavirus DNA load and cervical intraepithelial neoplasm risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Nov; 14(11 Pt 1):2544–9.

- Utaipat U, Siriaunkgul S, Supindham T, Saokhieo P, Chaidaeng B, Wongthanee A, et al. Association of cytologic grade of anal “Pap” smears with viral loads of human papillomavirus types 16, 18, and 52 detected in the same specimens from men who have sex with men. *J Clin Virol*. 2016;85:48–55.
- Vandesompele J, Preter K De, Poppe B, Roy N Van, Paepe A De. Accurate normalization of real-time quantitative RT -PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. 2002;1–12.
- Wang-Johanning F, Lu DW, Wang Y, Johnson MR, Johanning GL. Quantitation of human papillomavirus 16 E6 and E7 DNA and RNA in residual material from ThinPrep Papanicolaou tests using real- time polymerase chain reaction analysis. *Cancer* 2002;94:2199–210
- Wells JS, Holstad MM, Thomas T, Bruner DW. An integrative review of guidelines for anal cancer screening in HIV-infected persons. *AIDS Patient Care STDS*. 2014; 28: 350–7.
- Wentzensen N, Follansbee S, Borgonovo S, Tokugawa D, Sahasrabudde VV, Chen J, Lorey TS, Gage JC, Fetterman B, Boyle S, Sadorra M, Tang SD, Darragh TM, Castle PE. Analytic and clinical performance of cobas HPV testing in anal specimens from HIV-positive men who have sex with men. *J Clin Microbiol*. 2014 Aug;52(8):2892-7. doi: 10.1128/JCM.03517-13. Epub 2014 Jun 4. PMID: 24899025; PMCID: PMC4136172
- Wentzensen N, Schiffman M, Palmer T, Arbyn M. Triage of HPV positive women in cervical cancer screening. *J Clin Virol*. 2016 Mar;76 Suppl 1(Suppl 1):S49-S55
- Winer RL, Xi LF, Shen Z, Stern JE, Newman L, Feng Q, et al. Viral load and short-term natural history of type-specific oncogenic human papillomavirus infections in a high-risk cohort of midadult women. *Int J Cancer*. 2014 ;134(8):1889–98. doi: 10.1002/ijc.28509.
- Wu M, Li W, Cha N, Tian L. Diagnostic Utility of HPV16 E6 mRNA or E7 mRNA Quantitative Expression for Cervical Cells of Patients with Dysplasia and Carcinoma. *Cell Transplantation* 2018;27(155):1401–6.
- Wu Z, Qin Y, Yu L, Lin C, Wang H, Cui J, et al. Association between human papillomavirus (HPV) 16, HPV18, and other HR-HPV viral load and the histological classification of cervical lesions: Results from a large-scale cross-sectional study. *J Med Virol*. 2017;89(3):535–41.
- Xi L, Schiffman M, Ke Y, Hughes JP, Galloway DA, He Z, et al. Type-dependent association between risk of cervical intraepithelial neoplasia and viral load of oncogenic human papillomavirus types other than types 16 and 18. *Int J Cancer*. 2017;140(8):1747–56.
- Xi, L. F., Hughes, J. P., Castle, P. E., Edelstein, Z. R., Wang, C., Galloway, D. A., Schiffman, M.. Viral load in the natural history of human papillomavirus type 16 infection: a nested case–control study. *Journal of Infectious Diseases*, 2011;203(10), 1425-1433.
- Zheng, Z.M.; Baker, C.C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front. Biosci*. 2006, 11, 2286–2302.
- zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 2000 May 3;92(9):690-87

7. DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado em duas populações de mulheres vulneráveis à infecção por HPV ou à progressão da infecção para o CCU e CA, a fim de evidenciar a frequência dos genótipos de HPV, variantes de HPV16, carga viral e quantificação mRNA E7 dos HR-HPV incluídos na vacina nonavalente, estudo até então inédito no Brasil.

Diferentes populações, especialmente as geograficamente isoladas ou semi-isoladas, como no caso dos quilombolas, podem exibir características distintas de infecções por HPV, que podem estar relacionadas à ancestralidade, ao estilo de vida e ao comportamento sexual. Os resultados demonstraram uma frequência relativamente baixa de HPV (11,4%) em uma amostra populacional de 273 mulheres de 16 destas comunidades. A maioria dos estudos de prevalência de HPV se concentra em populações urbanas. Até o momento, apenas dois estudos publicados descreveram a infecção por HPV em mulheres quilombolas, ambos no nordeste do Brasil. Estes estudos revelaram prevalências similares de HPV, de 12,6% e 13%, em populações de 353 e 395 mulheres, respectivamente (BATISTA et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2018). Em mulheres que vivem também em áreas rurais em todo o mundo, independentemente da etnia, foi descrita uma baixa frequência de HPV, variando de 10-26% (DE LIMA SOARES et al., 2003; SOWJANYA et al., 2005; THAPA et al., 2018). Por outro lado, essas taxas contrastam com as encontradas em centros urbanos em todo o mundo, que variaram de 27,7-52,7% (PISTA et al., 2011; COSER et al., 2013; WHEELER et al., 2013), em parte sugerindo que o contato limitado com centros urbanos poderia restringir a taxa de infecção por HPV.

Uma grande variedade de genótipos (n= 31) de HPV foi observada na população de mulheres quilombolas e em mulheres HIV-positivas urbanizadas (n= 30) por meio das técnicas de RLB e RFLP. Utilizando a técnica *Linear Array*[®] como metodologia de tipagem, uma variedade menor de genótipos de HPV (20 e 25) foi descrita nos dois outros estudos com mulheres quilombolas (BATISTA et al., 2017 e NASCIMENTO et al., 2018). Os estudos em populações urbanas de mulheres no Brasil descrevem uma variedade de 14 a 31 genótipos de HPV em HIV-negativas (COSER et al., 2013; ROCHA et al., 2013; SANTOS FILHO et al., 2016) e 18 a 37 genótipos em HIV-positivas (CERQUEIRA et al., 2007; LEVI et al., 2004; MELGAÇO et al., 2009; ROCHA- BRISCHILIARI et al., 2017; VOLPINI et al., 2017), utilizando *Linear Array*[®], RFLP, RLB ou sequenciamento como métodos de tipagem. Devemos considerar,

portanto, a limitação na comparação da diversidade de genótipos entre as diferentes populações devido às metodologias de genotipagem com diferentes sensibilidades e outras que se restringem à detecção de um número mais limitado de genótipos (EIDE & DEBAQUE, 2012).

Merece destaque que, apesar da baixa frequência de HPV nas mulheres quilombolas, a infecção mista foi um achado comum (48,4%), inclusive com até nove genótipos distintos em uma mesma amostra, maior do que o descrito nos outros estudos em mulheres quilombolas (BATISTA et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2018). Em todo o mundo, as taxas de infecção múltipla em mulheres de centros urbanos, independentemente do grau da lesão, variaram de 16,7-41,8% (PISTA et al., 2011; COSER et al., 2013; WHEELER et al., 2013). Não há consenso se os tipos de HPV em infecções múltiplas ocorrem em uma relação competitiva ou cooperativa. Enquanto Trottier et al. (2006) sugerem que uma interação entre os tipos de HPV pode aumentar o risco de lesão, outros estudos não mostraram uma associação com infecções múltiplas por HPV (ADCOCK et al., 2019; WENTZENSEN et al., 2009).

Os HR-HPV foram encontrados em mais de dois terços das mulheres quilombolas deste estudo, semelhante ao observado nos outros estudos com populações similares, inclusive em relação ao fato dos genótipos 52 e 58 estarem entre os mais frequentes (BASTISTA et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2018), em contraste com a baixa frequência de HPV16, tipo mais frequente na população brasileira em geral (COSER et al., 2013, 2016; LIPPMAN et al., 2010; SANTOS FILHO et al., 2016; MARTINS et al., 2016). Curiosamente, estudos sobre os genótipos do HPV entre diferentes populações étnicas relataram que os HPV16 e 18 foram menos prevalentes entre mulheres negras em comparação com mulheres brancas (VIDAL et al., 2014; MONTEALEGRE et al., 2018). Esses dados também são apoiados por estudos com mulheres africanas do Quênia e de Moçambique, que mostraram o HPV58 seguido pelos tipos HPV16, HPV53 e HPV18, e o HPV52 seguido por HPV35, 16 e 53 como os mais frequentes nessas populações, respectivamente (DE VUYST et al., 2010; OMAR et al., 2017). No entanto, não está claro porque essas mulheres têm menos probabilidade de serem infectadas com HPV16 e 18. Vidal et al. (2014) sugerem que mulheres afrodescendentes, que abrigam outros HR-HPV, podem ser mais resistentes ou ter menor exposição à infecção por HR-HPV16 e 18. Outros fatores, como a

composição microbiota vaginal e cervical, podem influenciar na aquisição de certos tipos de HR-HPV (MITRA et al., 2015; HUANG et al., 2018).

Além da menor frequência de HPV16 e 18 observada em mulheres negras, estudos demonstram que mulheres HIV-positivas também são mais comumente infectadas com HR-HPV não-16 e 18, como 52 e 58 (LEVI et al., 2004; LUQUE et al., 2006; MCKENZIE et al., 2010). Interessantemente, Keller e colaboradores (2019), avaliaram diferenças na prevalência de HPV16 em mulheres com HIV e entre grupos raciais e étnicos e observaram que a prevalência do HPV16 foi menor em mulheres afro-americanas do que em mulheres caucasianas com NIC3, independentemente do estado imunológico. Esses achados vão ao encontro de nosso estudo que mostrou a menor frequência de HPV16 na população de mulheres negras (VOLPINI et al., 2021), assim como naquelas residentes em regiões com maior incidência de HIV, como em alguns países da África (DE VUYST et al., 2010; OMAR et al., 2017).

Nas mulheres HIV-positivas deste estudo, o HPV16 foi o tipo mais frequente, no geral, e a frequência dos demais genótipos variou de acordo com o estado de origem. O HPV16 foi o tipo mais frequente na Bahia, Pernambuco, Distrito Federal, Rio Grande do Sul e Paraná, corroborando com resultados anteriores nessas regiões (QUEIROZ et al., 2004; OLIVEIRA, P. et al., 2010; CERQUEIRA et al., 2007; ROCHA-BISHILIARI et al., 2014), com exceção de Pernambuco, em que Martins et al. (2014) descreveram o tipo 53 como o mais frequente. Os genótipos mais frequentes no Espírito Santo (HPV31) e no Rio de Janeiro (HPV52) representaram dados discordantes em relação a estudos anteriores. No Rio de Janeiro, Melgaço et al. (2011) detectaram os tipos 16 > 53 > 58 e Castilho et al. (2015) os tipos 58 > 53 > 16 como os HR-HPV mais frequentes. No Espírito Santo, nosso grupo de pesquisa anteriormente encontrou o HPV16 como o genótipo mais prevalente, seguido por HPV45 e 31, utilizando RLB e RFLP para genotipagem (VOLPINI et al., 2017), e HPV31, utilizando RFLP (MATTOS et al., 2011). É importante destacar que, além da diversidade de genótipos de HPV encontrados de acordo com a região geográfica, a distribuição dos genótipos de HPV também pode variar de acordo com a técnica de genotipagem utilizada em cada estudo (EIDE & DEBAQUE, 2012).

Dentre as amostras positivas para HPV16, a variante Europeia predominou na população estudada, fato observado também em outros estudos brasileiros em mulheres HIV-positivas e negativas (CRUZ et al., 2004; FREITAS et al., 2014;

SICHERO et al., 2007; TAMEGÃO-LOPES et al., 2014; VOLPINI et al., 2017). Foram identificadas também as variantes não Europeias Africana 2a e Asiático-Americana nas mulheres HIV-positivas. Sabe-se que a distribuição mundial de variantes está relacionada com a área geográfica, com o nível de mistura intrínseca de cada população e padrões recentes de migração humana (CHEN et al., 2011; SICHERO et al., 2007). Estes resultados podem ser interpretadas como consequência da colonização europeia do Brasil, do tráfico de escravos africanos durante o século XVI ao final do século XIX e da imigração asiática no século XX.

A caracterização dos genótipos de HPV em diferentes populações é importante para o monitoramento das vacinas atualmente licenciadas. A partir de 2014, o Ministério da Saúde incluiu a vacina 4vHPV contra o HPV no Calendário Nacional de Vacinação. Essa vacina é dirigida contra os genótipos mais frequentemente associados ao CCU (HR-HPV16 e 18) e a verrugas genitais (LR-HPV6 e 11) na população em geral (VILLA et al., 2006). No mesmo ano, o FDA aprovou a vacina nonavalente, dirigida contra os nove genótipos de HPV (HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58), que juntos causam cerca de 90% dos casos de CCU e condiloma em todo o mundo (FDA, 2014). Portanto, de acordo com os genótipos encontrados nas populações estudadas, ambas se beneficiariam da vacina 9vHPV, visto que os genótipos mais frequentes nas mulheres quilombolas, não são abrangidos pela vacina 4vHPV e dentre as mulheres HIV-positivas, seis tipos estão entre os mais frequentes dos sete HR-HPV cobertos pela vacina 9vHPV.

Além da determinação da frequência de HPV e seus tipos nessas populações vulneráveis, analisamos também se a carga viral e a quantificação de mRNA E7 poderiam ser utilizados como biomarcadores de lesão cervical e anal em indivíduos HIV-positivos e negativos. Esses biomarcadores se relacionam a estágios específicos da infecção pelo HPV na história natural do câncer, e, portanto, podem ser capazes de identificar lesões precursoras do câncer (TORNESELLO et al., 2013) e de fornecer subsídios na determinação da melhor conduta clínica. Este fato é importante pois o manejo de mulheres diagnosticadas com HSIL é o encaminhamento para biópsia e tratamento excisional em caso de NIC2/3 (BRASIL, 2016). Entretanto, as lesões HSIL/NIC2-3 são heterogêneas, especialmente aquelas classificadas como NIC2, que incluem tanto infecções produtivas por HR-HPV, capazes de regredir espontaneamente, como lesões precursoras do câncer invasivo (NIC3) (LEEMAN et

al., 2019). Portanto, biomarcadores capazes de diferenciar esses estágios, emergem como ferramentas importantes para diferenciar indivíduos com lesões pré-cancerosas ou com risco para progressão para o câncer invasivo daqueles com infecção transitória, evitando, por exemplo, tratamentos desnecessários.

Neste contexto, descrevemos a carga viral dos HR-HPV incluídos na vacina 9vHPV, parâmetro este que tem emergido como um potencial biomarcador de doença cervical (MARONGIU et al., 2014). Nós observamos uma maior carga viral nos casos de lesão cervical de mulheres quilombolas, mulheres HIV-negativas e em lesões cervicais e anais de indivíduos HIV-positivos, quando comparados à citologia normal. Quando os genótipos foram analisados individualmente, nós identificamos o aumento da carga viral dos HPV16 e 31 nas lesões cervicais de mulheres HIV-negativas e lesões cervicais e anais de indivíduos HIV-positivos, respectivamente. É importante ressaltar que diferentes genótipos de HPV podem ter mecanismos diferentes para desenvolver HSIL e a carga viral pode modificar esse risco (ADCOCK et al., 2019). Segundo Adcock e colaboradores (2019), HPV16, 33 e 31 são os genótipos com maior risco de doença pré-cancerosa e o risco para NIC2+ é acima de 10% para infecções com alta carga viral para esses tipos. Portanto, nossos resultados apontam para a importância de identificar mulheres com maior risco de HSIL com base na carga viral, de acordo com o genótipo do HPV e a população estudada e assim desenvolver algoritmos para melhorar o manejo clínico daqueles indivíduos que exibem alta carga viral, mesmo nos casos de citologia normal ou de baixo grau (ASCUS e LSIL).

É importante destacar que observamos alta carga viral do HPV 52 em mulheres quilombolas, genótipo mais frequente nesta população, em citologia normal e em ASCUS. De acordo com as diretrizes brasileiras para rastreamento do câncer cervical, a repetição da citologia é o manejo desses resultados citológicos. Porém, considerando a nossa população estudada (mulheres com média de idade de 42 anos, residentes em regiões semi-isoladas e com pouco acesso aos serviços de saúde) e a baixa sensibilidade da citologia, o teste de HR-HPV realizado simultaneamente ao teste de carga viral pode ser útil para identificar aquelas mulheres com maior risco de desenvolver lesões cervicais, aumentando o intervalo de triagem ou encaminhando-as para imediata colposcopia, ao invés de repetir a citologia.

Para determinar a quantidade de transcritos de *E7*, nós adaptamos o ensaio de carga viral adicionando uma etapa de digestão com DNase e uma etapa de transcrição

reversa. *E6* e *E7* são transcritos a partir do mesmo promotor que um único pré-RNA bicistrônico *E6/E7* (ZHENG; BAKER, 2006). Estudos mostram que a detecção de transcritos de mRNA do HPV *E6/E7* está relacionada à presença de HSIL cervical, sendo considerada um potencial biomarcador de lesão cervical e câncer (DERBIE et al., 2020; MACEDO et al., 2019). A maioria dos estudos avaliou apenas a detecção de mRNA *E6* ou *E7* e poucos estudos propuseram quantificar esses transcritos (WANG-JOHANNING et al., 2002; SCHEURER et al., 2005; 2007 HO et al., 2010; BORDIGONI et al., 2021). Comparado aos métodos de detecção, o uso qPCR permite uma comparação direta do número exato de cópias do mRNA de *E6/E7* em cada amostra por meio da construção da curva padrão em cada ensaio, permitindo estabelecer um *cut-off* em cada achado citológico, por exemplo.

Nós verificamos que, independentemente da positividade para o HIV ou do tipo de HPV, houve aumento da mediana de detecção de mRNA *E7* de normal para ASCUS+LSIL e HSIL ($p= 0,02$). Além disso, encontramos correlação moderada e positiva com o aumento da carga viral e mRNA *E7* ($r= 0,61$; $p< 0,001$), semelhante aos resultados de Baron et al. (2015), que demonstraram que mRNA *E6/E7* é mais frequentemente detectado em pacientes com maiores cargas virais de HPV. Além disso, Ho e colaboradores (2010) descreveram o aumento dos níveis de mRNA de *E6* de HPV 16, 18, 52 e 58 de normal e NIC 1 para NIC2+ e NIC3+. Poucos estudos avaliaram a detecção de mRNA em amostras anais, mas a maioria observou um aumento na positividade da detecção de mRNA com o aumento do grau de lesão anal (PHANUPHAK et al., 2013; WENTZENSEN et al., 2012, JIN et al., 2017).

Diante dos resultados apresentados, demonstramos a frequência dos genótipos de HPV e variantes do HPV16 em mulheres quilombolas e HIV-positivas. Além disso demonstramos o potencial da carga viral e da quantificação de mRNA *E7* como biomarcadores para diferenciar entre achados citológicos normais e anormais, levando a identificar os indivíduos HPV positivos com maior risco de desenvolver lesão anogenital. Esses resultados são relevantes para o estabelecimento de futuras estratégias no rastreamento do câncer e vacinação, voltadas principalmente para populações específicas de indivíduos com maior risco de desenvolvimento do CCU e CA.

8. CONCLUSÕES

- Houve uma baixa frequência de infecção por HPV em mulheres de comunidades quilombolas;
- Os genótipos HR-HPV52 e 58 foram mais frequentes nas mulheres quilombolas do que o HPV16;
- A variante Europeia do HPV16 predominou nas mulheres brasileiras HIV-positivas;
- Independente do genótipo, a mediana da carga viral foi maior nos casos de lesão cervical e anal de todas as populações investigadas (mulheres quilombolas, HIV-negativas e em indivíduos HIV-positivos) quando comparados à citologia normal;
- Quando comparada à citologia normal, houve um aumento da carga viral do HPV31 e 16 nos casos de lesão cervical e anal de indivíduos HIV-positivos e mulheres HIV-negativas, respectivamente;
- Houve aumento da mediana de mRNA E7 nos casos de citologia normal para ASCUS+LSIL e HSIL, independente do status do HIV ou tipo de HPV;
- Houve uma correlação moderada e positiva da mediana de mRNA E7 com o aumento da carga viral;
- Carga viral e quantificação de mRNA E7 demonstraram ser potenciais biomarcadores de lesão cervical e anal, por diferenciarem achados citológicos normais de anormais.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. L. et al. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. **Virology journal**, v. 9, n. 1, p. 262, 2012.
- ADCOCK, R. et al. Role of HPV genotype, multiple infections, and viral load on the risk of high-grade cervical neoplasia. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 28, n. 11, p. 1816-1824, 2019.
- AHDIEH, L. et al. Prevalence, incidence, and type-specific persistence of human papillomavirus in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative women. **The Journal of Infectious Disease**, v. 184, n. 6, p. 682–690, 2001.
- ARBYN, M. et al. Trends of cervical cancer mortality in the member states of the European Union. **European journal of cancer**, n. 45, v. 15, p. 2640-8 2009.
- ARYA, M. et al. Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 5, n. 2, p. 209-219, 2005.
- ANDERSSON, E. et al. Type-dependent E6/E7 mRNA expression of single and multiple high-risk human papillomavirus infections in cervical neoplasia. **Journal of Clinical Virology**, v. 54, n. 1, p. 61–65, 2012.
- BARON, C. et al. Relationship between HPV 16, 18, 31, 33, 45 DNA detection and quantitation and E6/E7 mRNA detection among a series of cervical specimens with various degrees of histological lesions. **Journal of medical virology**, v. 87, n. 8, p. 1389-1396, 2015.
- BATISTA, J. B. et al. Human papillomavirus genotypes 68 and 58 are the most prevalent genotypes in women from quilombo communities in the state of Maranhão, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 55, p. 51–55, 2017.
- BENNETT, M. D. et al. The first complete papillomavirus genome characterized from a marsupial host: a novel isolate from from *Bettongia penicillata*. **Journal of Virology**, v. 84, n. 10, p.5448–5453, 2010.
- BERNARD, H. U. et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. **Infectious Diseases Journal**, v. 170, n. 5, p.1077-1085, 1994.
- BERNARD, H. U.; CALLEJA-MACIAS, I. E.; DUNN, S. T. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. **International Journal of Cancer**, v. 118, n. 5, p. 1071–1076, 2005.
- BERNARD, H. U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70-79, 2010.
- BOLDRINI, N. A. T. et al. Anal HPV infection and correlates in HIV-Infected patients attending a sexually transmitted infection clinic in Brazil. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, p. 1–14, 2018.
- BORDIGONI, A. et al. Development and validation of a multiplex qPCR assay for detection and relative quantification of HPV16 and HPV18 E6 and E7 oncogenes. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2021.
- BOSCH, F. X. et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 55, n. 4, p. 244-65, 2002.

BOULET G. A. et al. Human papillomavirus 16 load and E2/E6 ratio in HPV16-positive women: biomarkers for cervical intraepithelial neoplasia \geq 2 in a liquid-based cytology setting? **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 18, n. 11, p. 2992-2999, 2009.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização de Rede. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. – 2. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro: INCA, 2016.

BRASIL. Fundação Cultural Palmares. Fundação Palmares certifica 103 quilombos em 2017, Brasília, 2017. Disponível em <<http://www.palmares.gov.br/?p=46307>> Acesso em 20 fev. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Incidência de câncer no Brasil, 2020, Rio de Janeiro: INCA. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>>. Acesso em 2 mar. 2020a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Ações de controle do câncer do colo do útero, 2020, INCA. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/controle-do-cancer-do-colo-do-utero/acoes-de-controle>>. Acesso em 15 fev. 2020b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instrução normativa referente ao calendário nacional de vacinação 2020. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/marco/04/Instru----o-Normativa-Calendario-Vacinal-2020.pdf>>. Acesso em 10 nov. 20. 2020c.

BRIOLAT, J. et al. HPV prevalence, viral load and physical state of HPV-16 in cervical smears of patients with different grades of CIN. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 10, p. 2198-2204, 2007.

BRUNI, L. et al. Cervical human Papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *Journal of Infectious Disease*, Barcelona, v. 202, n. 12, p. 1789–1799, 2010.

BRUNI, L. et al. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report 17 June 2019.

BRYAN, J. T.; BROWN, D. R. Association of the human papillomavirus type 11 E1^{E4} protein with cornified cell envelopes derived from infected genital epithelium. **Virology**, v. 277, n. 2, p. 262–9, 2000.

BUCK, C. B. et al. Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *Journal of Virology*, v. 82, n. 11, p. 5190-7, 2008.

BURK, R. D.; HARARI, A.; CHEN, Z. Human papillomavirus genome variants. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 232–43, 2013.

BURNS, D. A. “Warts and all” – the history and folklore of warts: a review. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 85, n. 1, p. 37–40, 1992.

CASTILHO, J. L. et al. A cross-sectional study of high-risk human papillomavirus clustering and cervical outcomes in HIV-infected women in Rio de Janeiro, Brazil. **BMC cancer**, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2015.

CASTLE, P. E. et al. Variable risk of cervical precancer and cancer after a human papillomavirus–positive test. **Obstetrics & Gynecology**, v. 117, n. 3, p. 650-656, 2011.

CDC. Centers for Disease Control Prevention. FDA licensure of quadrivalent human papillomavirus vaccine (HPV4, Gardasil) for use in males and guidance from the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*, v. 59, p.630–632, 2010.

CERQUEIRA, D. M. et al. High HPV genetic diversity in women infected with HIV-1 in Brazil. **Archives of Virology**, v. 152, n. 1, p. 75–83, 2007.

CHEN, Z. et al. Evolution and Taxonomic Classification of Human Papillomavirus 16 (HPV16)-Related Variant Genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. **Plos One**, v. 6, e20183, 2011.

CHEN, Z.; FREITAS, L. B.; BURK, R. D. Evolution and classification of oncogenic human papillomavirus types and variants associated with cervical cancer. **Methods in molecular biology**, v. 1249, p. 3-26, 2015.

CHIASSON, M. A. et al. Increased prevalence of vulvovaginal condyloma and vulvar intraepithelial neoplasia in women infected with the human immunodeficiency virus. **Obstetrics & Gynecology**, v. 89, p. 690-694, 1997.

COMBITA, A. L. et al. Gene transfer using human papillomavirus pseudovirions varies according to virus genotype and requires cell surface heparan sulfate. **FEMS Microbiology Letters**, v. 204, n. 1, p. 183–8. 2001.

COSER, J. et al. Prevalence and genotypic diversity of cervical human papillomavirus infection among women from an urban center in Brazil. **Genetic Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 4276-85, 2013.

COSER, J. et al. Cervical human papillomavirus infection and persistence: a clinic-based study in the countryside from South Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 61-68, 2016.

CRICCA, M. et al. Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions. **Gynecology Oncology**, v. 106, n. 3, p. 549–557, 2007.

CRUSIUS, K.; RODRIGUEZ, I.; ALONSO, A. The human papillomavirus type 16 E5 protein modulates ERK1/2 and p38 MAP kinase activation by an EGFR-independent process in stressed human keratinocytes. **Virus Genes**, v. 20, n. 1, p. 65–69, 2000.

CRUZ, Márcio R. et al. Prevalence of human papillomavirus type 16 variants in the Federal District, Central Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 281-282, 2004.

CUZICK, J. et al. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. **International journal of cancer**, v. 119, n. 5, p. 1095-1101, 2006.

DE LIMA SOARES, V. et al. Sexually transmitted infections in a female population in rural north-east Brazil: prevalence, morbidity and risk factors. **Tropical Medicine & International Health**, v. 8, n. 7, p. 595-603, 2003.

DE RODA HUSMAN, A. M. et al. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human

- papillomavirus detection by PCR. **The Journal of General Virology**, v. 76, p. 1057-62, 1995.
- DE VILLIERS, E. M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p.17-27, 2004.
- DE VILLIERS, E. M. Crossroads in the classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 2–10, 2013.
- DE VUYST, H. et al. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. **International journal of cancer**, v. 124, n. 7, p. 1626–36, 2009.
- DE VUYST, H. et al. The prevalence of human papillomavirus infection in Mombasa, Kenya. **Cancer Causes & Control**, v. 21, n. 12, p. 2309-2313, 2010.
- DEL RÍO-OSPINA, Luisa et al. The DNA load of six high-risk human papillomavirus types and its association with cervical lesions. **BMC cancer**, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2015.
- DENNY, L. A.; WRIGHT, T. C. Human papillomavirus testing and screening. Best practice & research. **Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 19, n. 4, p. 501–15, 2005.
- DERBIE, A. et al. HPV E6/E7 mRNA test for the detection of high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2+): a systematic review. **Infectious agents and cancer**, p. 1–10, 2020.
- DIJKSTRA, M. G. et al. Cervical cancer screening: on the way to a shift from cytology to full molecular screening. **Annals of oncology**, v. 25, n. 5, p. 927-935, 2014.
- DING, D. C. et al. Methylation of the long control region of HPV16 is related to the severity of cervical neoplasia. **The European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 147, n. 2, p. 215–20, 2009.
- DOORBAR, J. et al. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. **Nature**, v. 352, n. 6338, p. 824–7, 1991.
- DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical Science**, v. 110, n. 5, p. 525-41, 2006.
- DOORBAR J. Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. **Disease markers**, v. 23, n. 4, p. 297-313, 2007.
- DOORBAR, J. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30, Suppl.5, p. F55-70, 2012.
- DUERR, A. et al. Human papillomavirus-associated cervical cytologic abnormalities among women with or at risk of infection with human immunodeficiency virus. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 184, n. 4, p. 584–590, 2001.
- EBISCH, R. M. F. et al. Triage of high-risk HPV positive women in cervical cancer screening. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 16, n. 10, p. 1073–1085, 2016.
- EGAWA, N. et al. Human papillomaviruses: Epithelial tropisms, and the development of neoplasia. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3863–3890, 2015.
- EIDE, M. L.; DEBAQUE, H. HPV detection methods and genotyping techniques in screening for cervical cancer. **Annales de pathologie**, v.32, n. 6, p. 401-9, 2012.

ESTRADE, C. et al. Validation of a low-cost human papillomavirus genotyping assay based on PGM1 PCR and reverse blotting hybridization with reusable membranes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 3474-81, 2011.

EVANDER, M. et al. Identification of the α -6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. **Journal of Virology**, v. 71, n. 3, p. 2449–2456, 1997.

FDA. Food and drug administration. Gardasil Vaccine Safety. Silver Spring, 2009. Disponível em: <<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/VaccineSafety/ucm179549.htm>> Acesso em 22 jul. 2020.

FDA. Food and Drug Administration. Highlights of prescribing information. Gardasil 9 (Human Papillomavirus 9-valent Vaccine, Recombinant). Silver Spring, 2014. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/UCM426457.pdf>>. Acesso em 22 jul. 2020.

FEHRMANN, F.; KLUMPP, D. J.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. **Journal of Virology**, v. 77, n. 5, p. 2819–31, 2003.

FLORES, R et al. Cross-sectional analysis of oncogenic HPV viral load and cervical intraepithelial neoplasia. **International Journal of Cancer**, v. 118, n. 5, p. 1187–1193, 2006.

FLORIN, L. et al. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. **Journal of Virology**, v. 76, n. 19, p. 10009–14, 2002.

FONTAINE, V. et al. Evaluation of combined general primer-mediated PCR sequencing and type-specific PCR strategies for determination of human papillomavirus genotypes in cervical cell specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 928-934, 2007.

FREITAS, L. B. et al. Human papillomavirus 16 non-European variants are preferentially associated with high-grade cervical lesions. **PloS one**, v. 9, n. 7, p. e100746, 2014.

GARIGLIO, P. et al. The role of retinoid deficiency and estrogens as cofactors in cervical cancer. **Archives of medical research**, v.40, n. 6, p. 449-65, 2009.

GENTHER, S. M. et al. Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle. **Journal of Virology**, v. 77, n. 5, p. 2832–42, 2003.

GIROGLOU, T. et al. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. **Journal of Virology**, v. 75, n. 3, p. 1565-70, 2001.

GRAVITT, P. E. et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p.357-61, 2000.

GRAVITT, P. E. et al. Reproducibility of HPV 16 and HPV 18 viral load quantitation using TaqMan real-time PCR assays. **Journal of Virological Methods**, v. 112, n. 1–2, p. 23–33, 2003.

GOUY, M.; GUINDON, S.; GASCUEL, O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 2, p. 221-224, 2010.

HAFNER, N. et al. Integration of the HPV16 genome does not invariably result in high levels of viral oncogene transcripts. **Oncogene**, v. 27, n. 11, p. 1610–7, 2008.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–8, 1999.

HEIDEMAN, D. A.; et al. Clinical validation of the Cobas 488 HPV test for cervical screening purposes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, v. 11, p. 3983–3985, 2011.

HERBEST, L. H. et al., Genomic characterization of two novel reptilian papillomaviruses, *Cheloniamydas papillomavirus 1* and *Caretta caretta papillomavirus 1*. **Virology** v. 383, n. 1, p. 131-135, 2009.

HERFS, M. et al. A novel blueprint for “top down” differentiation defines the cervical squamocolumnar junction during development, reproductive life, and neoplasia. **Journal of Pathology**, v. 229, n. 3, p. 460–468, 2013.

HESSELINK, A. T et al. High-risk human papillomavirus DNA load in a population-based cervical screening cohort in relation to the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 3, p. 381–386, 2009.

HIGUCHI, R. et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, v. 11, n. 9, p. 1026–30, 1993.

HO, L., et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *Journal of Virology*, v. 67, n. 11, p. 6413-23, 1993.

HOLLAND, P. M. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 16, p. 7276–80, 1991.

HOLLY, E. A. et al. Prevalence and risk factors for anal squamous intraepithelial lesions in women. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, n. 11, p. 843–849, 2001.

HOWLEY, P. M.; LOWY, D. R. Papillomaviruses. in: KNIPE D M, HOWLEY P M, GRIFFIN D E, LAMB R A, MARTIN M A, ROIZMAN B, STRAUS S E (ed). *Fields Virology*, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

HOOTS, B. et al. Human papillomavirus type distribution in anal cancer and anal intraepithelial lesions. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 10, p. 2375–2383, 2009.

HPV CENTER - International Human Papillomavirus Reference Center. Disponível em: <<http://www.hpvcenter.se/html/refclones.html>>. Acesso em 2 mar. 2021.

HUANG, S. Z. et al. Detection of sickle cell gene by analysis of amplified DNA sequences. **Yi Chuan Xue Bao**, v. 16, n. 6, p. 475-82, 1989.

HUANG, X. et al. Cervicovaginal microbiota composition correlates with the acquisition of high-risk human papillomavirus types. **International journal of cancer**, v. 143, n. 3, p. 621-634, 2018.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Efficacy of screening. IARC Handbooks of Cancer Prevention, v. 10, p. 117–162, 2005. Disponível em <<http://www.iarc.fr/en/publications/pdfsonline/prev/handbook10/HANDBOOK10.pdf>> Acesso em 19 jul. 2020.

IARC. International Agency for Research on Cancer. A Review of Human Carcinogens: Biological Agents. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 100, p. 255–296, 2012.

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy: 2019 Release. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>> Acesso em: 2 mar. 2021.

JEON, S.; ALLEN-HOFFMANN, B. L.; LAMBERT, P. F. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. **Journal of Virology**, v. 69, n. 5, p. 2989–97, 1995.

JEON, S.; LAMBERT, P. F. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 5, p. 1654–8, 1995.

JIN, F. et al. The performance of human papillomavirus biomarkers in predicting anal high-grade squamous intraepithelial lesions in gay and bisexual men. **AIDS**, v. 31, p. 1303–1311, 2017.

JOHNSON, K. M. et al. Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. **Journal of Virology**, v. 83, n. 5, p. 2067–74, 2009.

KABSCH K. et al. The HPV-16 E5 protein inhibits TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in human keratinocyte raft cultures. **Intervirolgy**, v. 47, n. 1, p. 48–56, 2004.

KIM, R. H. et al: HIV-1 Tat enhances replicative potential of human oral keratinocytes harboring HPV-16 genome. **International Journal of Oncology**, v. 33, n. 4, p. 777–782, 2008.

KIRNBAUER, R. et al. Papillomavirus L1 major capsid protein self- assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 89, n. 24, p. 12180–4, 1992.

KLINGELHUTZ, A. J.; ROMAN, A. Cellular transformation by human papillomaviruses: lessons learned by comparing high- and low-risk viruses. **Virology**, v.424, n. 2, p. 77–98, 2012.

KRAWCZYK, E. et al. Membrane orientation of the human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein. **Journal of Virology**, v. 84, n. 4, p. 1696–703, 2010.

LECHNER, M. S.; LAIMINS, L. A. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. **Journal of Virology**, v. 68, n. 7, p. 4262–4273, 1994.

LEEMAN, A. et al. Reliable identification of women with CIN3+ using hrHPV genotyping and methylation markers in a cytology-screened referral population. **International journal of cancer**, v. 144, n. 1, p. 160-168, 2019.

- LEHR, E. et al. Infection with human papillomavirus alters expression of the small proline rich proteins 2 and 3. **Journal of Medical Virology**, v. 72, n. 3, p. 478–83, 2004.
- LETO, M. D. G. P. et al. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. **Anais brasileiros de dermatologia**, São Paulo, v. 86, n. 2, p. 306–317, 2011.
- LEVI, E. et al. Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. **Gynecologic Oncology**, v. 92, p. 225–231, 2004.
- LIPPMAN, S. A. et al. Prevalence, distribution and correlates of endocervical human papillomavirus types in Brazilian women. **International journal of STD & AIDS**, v. 21, n. 2, p. 105-109, 2010.
- LOZER, Diego Martins. Patotipos de *Escherichia coli* diarreio gênica em crianças quilombolas com e sem diarreia, do norte do Espírito Santo. 2011. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2011.
- LUHN, P.; WENTZENSEN, N. HPV-based tests for cervical cancer screening and management of cervical disease. **Current obstetrics and gynecology reports**, v. 2, n. 2, p. 76-85, 2013.
- MACEDO, A. C. et al. Accuracy of mRNA HPV Tests for Triage of Precursor Lesions and Cervical Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis, **Journal of Oncology**, 2019.
- MANOS, M. M. et al. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Cancer Cells**, v. 7, p. 209-214, 1989.
- MARONGIU, L. et al. Human Papillomavirus 16, 18, 31 and 45 viral load, integration and methylation status stratified by cervical disease stage. **BMC cancer**, v. 14, n. 1, p. 384, 2014.
- MARRA, E. et al. Anal HPV 16 and 18 viral load : A comparison between HIV-negative and -positive MSM and association with persistence. **Journal of Medical Virology**, n. 90, p. 76–83, 2018.
- MARTENS, J. E. et al. Distribution pattern and marker profile show two subpopulations of reserve cells in the endocervical canal. **International Journal of Gynecology Pathology**, v. 28, n. 4, p. 381–388, 2009.
- MARTINS, Toni Ricardo et al. HPV genotype distribution in Brazilian women with and without cervical lesions: correlation to cytological data. **Virology journal**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2016.
- MATTOS, A. T. et al. Diversity and uncommon HPV types in HIV seropositive and seronegative women attending an STI clinic. **Brazilian Journal of Microbiology**, , v. 42, p. 786-793, 2011.
- MCBRIDE, A. A. Replication and partitioning of papillomavirus genomes. **Advances in Virus Research**, v. 72, p. 155–205, 2008.
- MCKENZIE, N.D. et al. Women with HIV are more commonly infected with non-16 and non-18 high-risk HPV types. **Gynecology Oncology**, v. 116, n. 3, p. 572-577, 2009.

- MEIJER, C. J. et al. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. **International journal of cancer**, v. 124, n. 3, p. 516-520, 2009.
- MELGAÇO F. G. et al. Human papillomavirus genotypes distribution in cervical samples from women living with human immunodeficiency virus. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 283, n. 4, p. 809-17, 2011.
- MELSHEIMER, P. et al. DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 e6/e7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 9, p. 3059–63, 2004.
- MIDDLETON, K. et al. Organisation of the human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for the selection of diagnostic markers. **Journal of Virology**, v. 77, n. 19, p. 10186–201, 2003.
- MIRANDA, A. E. et al. High-risk papillomavirus infection among women living with human Immunodeficiency virus: Brazilian multicentric study. **Journal of medical virology**, v. 89, n. 12, p. 2217-2223, 2017.
- MITRA, A. et al. Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2015.
- MOLIJN, A. et al. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 32 Suppl 1:S43-51, 2005.
- MONTEALEGRE, J. R. et al. Racial/ethnic differences in HPV 16/18 genotypes and integration status among women with a history of cytological abnormalities. **Gynecologic oncology**, v. 148, n. 2, p. 357-362, 2018.
- MOODY, C. A; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature reviews Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550–60, 2010.
- MUNGER, K. et al. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. **EMBO Journal**, v. 8, n. 13, p. 4099–4105, 1989.
- MUNGER, K. et al. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. **Oncogene**, v. 20, n. 54, p. 7888–98, 2001.
- MUÑOZ, N. et al. HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24, S1–S10, 2006.
- NASCIMENTO, M. D. D. S. B. et al. Prevalence of human papillomavirus infection among women from quilombo communities in northeastern Brazil. **BMC Women's Health**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2018.
- NAUCLER, P. et al. HPV type-specific risks of high-grade CIN during 4 years of follow-up: A population-based prospective study. **British Journal of Cancer**, v. 97, n. 1, p. 129-32, 2007.
- NAVARRO, E., et al. Real-time PCR detection chemistry **Clinica Chimica Acta**, v. 439, p. 231–250, 2015.
- NAYLOR, S. Biomarkers: current perspectives and future prospects. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 3, n. 5, p. 525-529, 2003.

OGINO, S. et al. Molecular pathological epidemiology of epigenetics: emerging integrative science to analyze environment, host, and disease. **Modern Pathology**, v. 26, n. 4, p. 465-484, 2013.

OLIVEIRA, Paula Matos et al. Prevalence and risk factors for cervical intraepithelial neoplasia in HIV-infected women in Salvador, Bahia, Brazil. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 128, n. 4, p. 197-201, 2010.

OMAR, V. E. et al. Human papillomavirus prevalence and genotype distribution among young women and men in Maputo city, Mozambique. **BMJ open**, v. 7, n. 7, 2017.

OZBUN, M. A.; MEYERS, C. Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31b. **Journal of Virology**, v. 72, n. 4, p. 2715–22, 1998.

PALEFSKY, J. M.; RUBIN, M. The Epidemiology of Anal Human Papillomavirus and Related Neoplasia. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 36, n. 1, p. 187–200, 2009.

PARISH, J. L. et al. ChIR1 is required for loading papillomavirus E2 onto mitotic chromosomes and viral genome maintenance. **Molecular Cell**, n. 24, v. 6, p. 867–76, 2006.

PELT-VERKUIL, E.; VAN BELKUM, A.; HAYS, J. P. **Principles and technical aspects of PCR amplification**. Springer Science & Business Media, 2008.

PETROSKY, E. et al. Use of 9-valent human papillomavirus (HPV) vaccine: updated HPV vaccination recommendations of the advisory committee on immunization practices. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 64, n. 11, p. 296–9, 2015.

PETT, M. R. et al. Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes. **Cancer Research**, v. 64, n. 4, p. 1359–68, 2004.

PHANUPHAK, Nittaya et al. Use of human papillomavirus DNA, E6/E7 mRNA, and p16 immunocytochemistry to detect and predict anal high-grade squamous intraepithelial lesions in HIV-positive and HIV-negative men who have sex with men. **PLoS one**, v. 8, n. 11, p. e78291, 2013.

PIERANGELI, A. et al. Type-specific human papillomavirus-DNA load in anal infection in HIV-positive men. **Aids**, v. 22, n. 15, p. 1929-1935, 2008

PIM, D.; BANKS L. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. **APMIS**, v. 118, n. 6-7, p. 471–93, 2010.

PISTA, Angela et al. Molecular variants of human papillomavirus type 16 and 18 and risk for cervical neoplasia in Portugal. **Journal of medical virology**, v. 79, n. 12, p. 1889-1897, 2007.

PYEON, D. et al. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. **PLOS Pathogens**, v. 5, n. 2, e1000318, 2009.

RIRIE, K. M.; RASMUSSEN, R. P.; WITTEWER, C. T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. **Analytical biochemistry**, v. 245, n. 2, p. 154–60, 1997.

QUEIROZ, C. et al. Prevalence of human Papilloma Virus in HIV-positive and HIV-negative patients in the State of Bahia: a pilot study. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p. 356-362, 2004.

RIJKAART, D. C. et al. Human papillomavirus testing for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer: final results of the POBASCAM randomised controlled trial. **The lancet oncology**, v. 13, n. 1, p. 78-88, 2012.

ROCHA, D. A. P. et al. High prevalence and genotypic diversity of the human papillomavirus in Amazonian women, Brazil. **Infectious diseases in obstetrics and gynecology**, v. 2013, 2013.

ROCHA-BRISCHILIARI, S. C. et al. Risk factors for cervical HPV infection and genotypes distribution in HIV-infected South Brazilian women. **Infectious Agents and Cancer**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2014.

RONCO G. et al. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. **Lancet Oncology**, v. 11, n. 3, p. 249–57, 2010.

ROSE, R. C.; REICHMAN, R. C.; BONNEZ, W. Human papillomavirus (HPV) type 11 recombinant virus-like particles induce the formation of neutralizing antibodies and detect HPV-specific antibodies in human sera. **The Journal of General Virology**, v. 75, p. 2075–9, 1994.

ROUS, P.; BEARD, J. W. The progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas (Shope). **The Journal of Experimental Medicine**, v. 62, n. 4, p. 523–548, 1935.

SANKARANARAYANAN, Rengaswamy et al. HPV screening for cervical cancer in rural India. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 14, p. 1385-1394, 2009.

SANTOS FILHO, M. V. et al. Prevalence of human papillomavirus (HPV), distribution of HPV types, and risk factors for infection in HPV-positive women. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 15, n. 2, 2016.

SAUNIER, M. et al. Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for identification of HPV16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 11, p. 3678-3685, 2008.

SCHEURER, Michael E. et al. Correlation of human papillomavirus type 16 and human papillomavirus type 18 e7 messenger RNA levels with degree of cervical dysplasia. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 14, n. 8, p. 1948-1952, 2005.

SCHEURER, Michael E. et al. Absolute quantitative real-time polymerase chain reaction for the measurement of human papillomavirus E7 mRNA in cervical cytobrush specimens. **Infectious agents and cancer**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2007.

SCHIFFMAN, M.; WENTZENSEN, N. Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**, v. 22, n. 4, p. 553–60, 2013.

SCHIFFMAN, M. et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 16086, 2016.

SCHILLER, J. T.; DAY, P. M.; KINES, R. C. Current understanding of the mechanism of HPV infection. **Gynecology Oncology**, v. 118, S12–7, 2010.

- SCHLECHT, N. F. et al. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. **International Journal of Cancer**, v. 103, n. 4, p. 519-524, 2003.
- SCHOLEFIELD, J. H; CASTLE, M. T; WATSON, N. F. Malignant transformation of high-grade anal intraepithelial neoplasia. **British Journal of Surgery**, v. 92, p. 1133–6, 2005.
- SERRANO, B. et al. Potential impact of a nine-valent vaccine in human papillomavirus related cervical disease. **Infectious agents and cancer**, v. 7, n. 1, p. 38, 2012.
- SHERMAN, L. et al. Inhibition of serum- and calcium-induced differentiation of human keratinocytes by HPV16 E6 oncoprotein: role of p53 inactivation. **Virology**, v. 237, p. 296–306, 1997.
- SHOPE, R. E.; HURST, E. W. Infectious papillomatosis of rabbits: with a note on the histopathology. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 58, n. 5, p. 607–624, 1933.
- SICHERO, L. et al. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. **International Journal of Cancer**, v. 120, n. 8, p. 1763–1768, 2007.
- SMITH, J. S. et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 3, p. 621–632, 2007.
- SOLOMON, D. et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. **JAMA**, v. 287, n. 16, p. 2114–9, 2002.
- SOWJANYA, A. P. et al. Prevalence and distribution of high-risk human papilloma virus (HPV) types in invasive squamous cell carcinoma of the cervix and in normal women in Andhra Pradesh, India. **BMC infectious diseases**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2005.
- STANLEY, M. A. Replication of human papillomaviruses in cell culture. **Antiviral Research**, v. 24, n. 1, p. 1–15, 1994.
- STERLING, J. C.; SKEPPER, J. N.; STANLEY, M. A. Immunoelectron microscopical localization of human papillomavirus type 16 L1 and E4 proteins in cervical keratinocytes cultured in vivo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 100, n. 2, p. 154–8, 1993.
- STRAUSS, M. J. et al. Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 72, n. 1, p. 46–50, 1949.
- SUN, X. W. et al. Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. **New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 19, p. 1343–1349, 1997.
- SYRJÄNEM, K. J.; SYRJÄNEM, S. M. Papillomavirus infections in human pathology. New York: John Wiley & Sons LTD, 2000.
- TAMALET, C. et al. Distribution of Human Papillomavirus Genotypes, Assessment of HPV 16 and 18 Viral Load and Anal Related Lesions in HIV Positive Patients: A Cross-Sectional Analysis. **Journal of Medical Virology**, v. 86, p. 419–425, 2014.
- TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-9, 2013.

TAMEGÃO-LOPES, B. P. et al. Prevalence of human papillomavirus infection and phylogenetic analysis of HPV-16 E6 variants among infected women from Northern Brazil. **Infectious agents and cancer**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2014.

TANG, S. et al. The E7 oncoprotein is translated from spliced E6* I transcripts in high-risk human papillomavirus type 16-or type 18-positive cervical cancer cell lines via translation reinitiation. **Journal of virology**, v. 80, n. 9, p. 4249-4263, 2006.

TERAI, M., DESALLE, R., BURK, R.D. Lack of canonical E6 and E7 open reading frames in bird papillomaviruses: *Fringilla coelebs* papillomavirus and *Psittacus erithacus timneh* papillomavirus. **Journal of Virology**, v. 76, n. 19, p. 10020–10023, 2002.

THAPA, N. et al. Prevalence and type-specific distribution of human papillomavirus infection among women in mid-western rural, Nepal-A population-based study. **BMC infectious diseases**, v. 18, n. 1, p. 1-8, 2018.

THOMSEN, P. et al. The HPV16 E5 oncogene inhibits endocytic trafficking. **Oncogene**, v. 19, n. 52, p. 6023–32, 2000.

THORLAND, E. C. et al. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. **Oncogene**, v. 22, n. 8, p.1225–37, 2003.

TORNESELLO, M. L. et al. Identification and functional analysis of sequence rearrangements in the long control region of human papillomavirus type 16 Af-1 variants isolated from Ugandan penile carcinomas. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 2969–2982, 2000.

TORNESELLO, M. L. et al. Analysis of human papillomavirus type-16 variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. **Journal of Medical Virology**, v. 74, n. 1, p. 117–126, 2004.

TORNESELLO, M. L. et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes and their variants in high risk West Africa women immigrants in South Italy. **Infectious agents and cancer**, v. 2, p. 1-9, 2007.

TORNESELLO, M. L. et al. Viral and cellular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

TROTTIER, T. et al. Human Papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 15, n. 7, p. 1274–1280, 2006.

TUGIZOV S. M. et al. HIV-associated disruption of mucosal epithelium facilitates paracellular penetration by human papillomavirus. **Virology**, v. 446, n. 1-2, p. 378–88, 2013.

VACCARELLA, S. et al. Worldwide trends in cervical cancer incidence: impact of screening against changes in disease risk factors. **European Journal of Cancer**, n. 49, v. 15, p. 3262–73, 2013.

VAN DER BURG, S. H.; PALEFSKY, J. M. Human immunodeficiency virus and human papilloma virus - why HPV-induced lesions do not spontaneously resolve and why therapeutic vaccination can be successful. **Journal of translational medicine**, v. 7, p. 108, 2009.

- VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7 p. 1–12, 2002.
- VICENTINI, Fernando. Estudo molecular de vírus associados à diarreia em crianças quilombolas do norte do estado do Espírito Santo. 2013. Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas) – Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013.
- VIDAL, A. C. et al. HPV genotypes and cervical intraepithelial neoplasia in a multiethnic cohort in the southeastern USA. **Cancer Causes & Control**, v. 25, n. 8, p. 1055-1062, 2014.
- VILLA L. L. Prophylactic HPV vaccines: reducing the burden of HPV-related diseases. **Vaccine**, v. 24, Suppl 1, S23-28, 2006.
- VOLPINI, L. P.B. et al. The high prevalence of HPV and HPV16 European variants in cervical and anal samples of HIV-seropositive women with normal Pap test results. **Plos One**, v. 12, n. 5, e0178357, 2017.
- WALBOOMERS, J. M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **The Journal of Pathology**, v. 189, n. 1, p. 12–9, 1999.
- WANG, Q. et al. Functional analysis of the human papillomavirus type 16 E1^{E4} protein provides a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament re-organization. **Journal of Virology**, v. 78, n. 2, p. 821–33, 2004.
- WANG-JOHANNING, Feng et al. Quantitation of human papillomavirus 16 E6 and E7 DNA and RNA in residual material from ThinPrep Papanicolaou tests using real-time polymerase chain reaction analysis. **Cancer**, v. 94, n. 8, p. 2199-2210, 2002.
- WEISSENBORN et al. Quantification of beta-human papillomavirus DNA by real-time PCR. **Nature protocols**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 2010.
- WELLS, J. S. et al. An integrative review of guidelines for anal cancer screening in HIV-infected persons. **AIDS Patient Care STDS**, v. 28, p. 350-7, 2014.
- WENTZENSEN, N. et al. Multiple human papillomavirus genotype infections in cervical cancer progression in the study to understand cervical cancer early endpoints and determinants. **International journal of cancer**, v. 125, n. 9, p. 2151-2158, 2009.
- WENTZENSEN, Nicolas et al. Human papillomavirus genotyping, human papillomavirus mRNA expression, and p16/Ki-67 cytology to detect anal cancer precursors in HIV-infected MSM. **AIDS (London, England)**, v. 26, n. 17, p. 2185, 2012.
- WENTZENSEN, N.; SCHIFFMAN, M. Filling a gap in cervical cancer screening programmes. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 3, p. 249–51, 2014.
- WENTZENSEN, N. et al. Triage of HPV positive women in cervical cancer screening. **Journal of Clinical Virology**, v. 76, n. Suppl 1, p. S49-S55, 2016.
- WHEELER, C. M. et al. A population-based study of human papillomavirus genotype prevalence in the United States: baseline measures prior to mass human papillomavirus vaccination. **International journal of cancer**, v. 132, n. 1, p. 198-207, 2013.
- WHELAN, J. A.; et al. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. **Journal of Immunological Methods**, v. 278, n. 1-2, p. 261– 269, 2003.

WILSON, V. G. et al. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. **Virus Genes**, v. 24, n. 3, p. 275–90, 2002.

WHO. World Health Organization. Human papillomavirus vaccines. WHO position paper. *Weekly Epidemiological Record*, v. 84, n. 15, p. 118–131, 2009.

WHO. World Health Organization. Human papillomavirus laboratory manual. Immunization, Vaccines and Biologicals. First Edition, 2010.

WHO. World Health Organization. Pan American Health Organization. HPV Tests For Cervical Cancer Screening. Disponível em <<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/HPV-Tests-TABLES-123-ok.pdf>> Acesso em 22 nov. 2020.

WINER, R. L. et al. Viral load and short-term natural history of type-specific oncogenic human papillomavirus infections in a high-risk cohort of midadult women. *International journal of cancer. International Journal of Cancer*, v. 134, n. 8, p. 1889–98, 2014.

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature reviews Cancer*, Londres, v. 7, n. 1, p. 11–22, 2007.

XI, L. F. et al. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, n. 11, p. 796–802, 1997.

XI, L. F. et al. Acquisition and natural history of human papillomavirus type 16 variant infection among a cohort of female university students. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 11, n. 4, p. 343–351, 2002.

XI, L. F. et al. Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 98, n. 15, p. 1045–1052, 2006.

XI, L. F. et al. Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 16, p. 4–10, 2007.

YAMADA, T. et al. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States population characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2 and L1 coding segments. **Journal of Virology**, v. 69, p. 7743–53, 1995.

YAMADA, T. et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. **Journal of virology**, v. 71, n. 3, p. 2463–2472, 1997.

ZHENG, Z.-M et al. Splicing of a cap-proximal human papillomavirus 16 E6E7 intron promotes E7 expression, but can be restrained by distance of the intron from its RNA 5' cap. **Journal of molecular biology**, v. 337, n. 5, p. 1091-1108, 2004.

ZHENG, Z. M.; BAKER, C. C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, p. 2286-2302, 2006.

ZHOU, J. et al. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. **Virology**, v. 185, n. 1, p. 251–7, 1991.

ZUR HAUSEN, H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 78, p. 1–30, 1977.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342-350, 2002.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 260–265, 2009.

ANEXOS

ANEXO A - Padrão de digestão de genótipos mucosos de HPV.

Tipo HPV	<i>BamHI</i>	<i>DdeI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinI</i>	<i>PstI</i>	<i>RsaI</i>	<i>Sau3AI</i>
HPV-6b	449	382 67	217 124 108	234 215	449	161 149 72 67	366 63 20
HPV-11	336 83	447 2	217 124 108	234 215	242 207	216 135 72 26	366 63 20
HPV-13	372 83	326 67 62	204 127 124	240 215	242 213	175 135 73 72	372 63 20
HPV-16	452	452	444 8	452	216 210 26	310 72 70	369 63 20
HPV-18	372 83	432 23	455	455	242 213	135 125 85 72 38	372 63 20
HPV-26	455	455	455	455	353 102	365 72 18	372 63 20
HPV-31	452	283 167 2	328 124	237 215	216 210 26	380 72	369 63 20
HPV-31b	452	285 90 77	328 124	237 215	216 210 26	380 72	369 63 20
HPV-32	366 83	320 108 21	317 124 8	234 215	449	216 161 72	366 63 20
HPV-33	449	320 77 52	449	234 215	242 207	236 102 72 39	267 162 20
HPV-34	458	211 151 88 8	334 124	458	253 179 26	186 161 96 15	438 20
HPV-35	452	294 135 23	261 180 8 3	452	426 26	177 161 72 42	369 63 20
HPV-39	455	324 131	455	355 100	330 125	260 123 72	249 123 63 20
HPV-40	240 132 83	297 158	447 8	455	455	365 90	240 132 63 20
HPV-42	366 83	341 108	449	234 215	449	242 135 72	366 63 20
HPV-44	455	297 112 46	223 124 108	455	455	222 161 72	405 30 20
HPV-45	372 83	324 131	447 8	455	242 213	338 72 45	372 63 20
HPV-51	237 215	362 90	379 73	452	452	380 72	237 132 63 20
HPV-52	449	357 92	258 183 8	449	423 26	449	366 63 20
HPV-53	449	206 158 85	232 217	368 81	449	449	342 87 20
HPV-54	369 83	452	217 127 108	234 218	452	138 125 117 72	369 63 20
HPV-55	455	112 111 101 85 46	215 124 108 8	215 207 33	455	165 161 72 57	405 30 20
HPV-56	449	307 142	275 166 8	449	242 207	310 72 49 18	429 20
HPV-57	449	211 142 50 46	449	449	296 153	449	328 38 33 26 24

HPV-58	449	348 101	449	235 214	216 207 28	306 111 32	366 57 20 6
HPV-59	452	452	396 56	452	426 26	452	402 24 20 6
HPV-61	455	455	212 211 24 8	455	455	185 180 72 18	372 63 20
HPV-62	449	449	232 217	449	341 108	359 72 18	399 30 20
HPV-64	375 83	211 151 87 9	334 124	367 91	253 179 26	186 161 72 39	375 63 20
HPV-66	366 83	291 158	449	449	207 150 66 26	449	366 63 20
HPV-67	449	307 92 50	266 183	234 215	423 26	310 72 67	366 63 20
HPV-68	372 83	455	455	215 140 100	455	260 85 72 38	249 123 63 20
HPV-69	372 83	455	223 183 49	455	455	365 72 18	372 33 30 20
HPV-82	455	288 167	455	241 214	455	383 72	435 20
HPV-83	369 83	452	383 69	452	317 135	380 72	369 63 20
HPV-84	452	220 142 90	346 106	214 106 95 37	452	310 142	369 63 20
HPV-73	458	243 215	458	458	432 26	201 161 96	408 30 20
HPV-72	452	297 155	220 208 24	452	452	362 72 18	369 63 20
HPV-82	455	243 212	455	241 214	455	383 72	435 20
HPV-70	372 83	455	232 117 106	240 215	242 213	231 123 72 29	372 63 20
HPV-89	369 83	246 152 54	325 127	452	452	380 72	369 33 24 20 6
HPV-81	452	452	127 121 108 96	452	341 11	452	432 20
HPV-72	455	300 155	220 211 24	455	455	365 72 18	372 63 20
HPV-71	452	320 132	217 127 108	346 106	360 92	380 72	381 51 20

ANEXO B – Parecer do CEP

UFES - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO ESPÍRITO

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Potenciais biomarcadores como preditores de câncer do colo do útero e anal por genótipos de HPV de alto risco em populações vulneráveis (soropositivos para HIV e mulheres quilombolas)

Pesquisador: Liliana Cruz Spano

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 89699618.7.0000.5060

Instituição Proponente: Centro de Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.925.324

Apresentação do Projeto:

Quarta versão de projeto A pesquisa objetiva investigar se a carga viral e expressão de oncogenes dos HR-HPV mais prevalentes estão relacionadas com lesões cervicais e anais em populações vulneráveis, HIV+ e mulheres quilombolas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

VITORIA, 28 de Setembro de 2018

Assinado por:

Maria Helena Monteiro de Barros Miotto
(Coordenador(a))

ANEXO C – Questionário Estruturado aplicado a mulheres residente em comunidades quilombolas

Prevenção de câncer de colo uterino em mulheres de comunidades quilombolas no Espírito Santo

Número do prontuário :

Bairro/Município de Residência :

Naturalidade :

USO DE CIGARROS E DROGAS

Você fuma? 1. sim 2. Não

Quantos cigarros?

1. Irregularmente, de tempo em tempo 2. Menos de 5 cigarros por dia
3. De 5 à 20 cigarros por dia 4. Mais de de 20 cigarros por dia (mais de um maço)

Se não, você já fumou?

1. Sim, 1 ou 2 vezes 2. Sim, regularmente 3. Não, nunca

Durante a semana que passou, você bebeu alguma bebida alcoolica (cerveja, vinho, aperitivos, etc)?

1. Não 2. Uma vez 3. Várias vezes 4. Ficou bêbada

Você utiliza algum medicamento do tipo?

1. Para dormir 2. Para ansiedade e stress 3. Antidepressivos
4. Excitantes 5. Não Se sim, qual? _____

Você já utilizou algum outro tipo de droga?

1. Não 2. Cola, éter 3. Cocaína 4. Crack
5. Remédios 6. Outras _____

Você já utizou droga injetável?

1. Sim 2. Não 3. NR

INFORMAÇÃO CONTRACEPTIVA

Você utiliza algum método contraceptivo?

1. Pilula 2. Preservativo 3. DIU 4. Muco cervical/Billings
5. Temperatura
6. Tabela 7. Diafragma 8. Pilula do dia seguinte 9. Preservativo feminino
10. Não

Você e seu parceiro utilizam preservativos ? 1. Sim 2. Não

Se sim, com que frequencia vocês fazem uso do preservativo?

1. sempre 2. Às vezes 3. Raramente 4. Nunca

HISTORIA SEXUAL E REPRODUTIVA

Qual era sua idade quando você teve a primeira relação sexual? |_|_| anos

Qual era a idade de seu parceiro/a? |_|_| anos

Você tem ou já teve relação sexual anal? 1. Sim 2. Não 3. NR

Você já teve relação sexual com outra mulher? 1. Sim 2. Não 3. NR

Em média, quantas relações você tem (ou tinha) por semana? |_|_|_|_|

Quantos parceiros sexuais masculinos você já teve na vida? |_|_|_|_|

Quantos parceiros sexuais masculinos você teve nos últimos 12 meses? |_|_|_|_|

Você já engravidou?

1. Nunca 2. Uma vez 3. Várias vezes

Se sim, qual era sua idade na primeira gravidez? |_|_|_|anos

Número: filhos () Abortos espontâneos () Abortos provocados ()

Você está grávida? 1. sim 2. Não

SAUDE, DST E AIDS

Qual foi a última vez que você fez exame ginecológico (preventivo)?

Você sabe dizer se você já teve alguma doença transmitida sexualmente? 1. Sim 2. Não

Se sim, qual? _____

Como você descobriu essa doença/infecção ?

1. Seu parceiro lhe disse que estava infectado
2. Você apresentou sintomas que a levaram procurar um serviço de saúde
3. Durante uma consulta de rotina ou por outro motivo

Na ocasião dessa doença você procurou

1. Ninguém
2. Um médico/ Unidade do PSF
3. Uma farmácia
4. Serviço de DST

Você avisou a seu parceiro que você tinha uma DST? 1. Sim 2. Não

Após o diagnóstico da DST você utilizou mais frequentemente o preservativo ?

1. Sim 2. Não

Após o diagnóstico da DST você reduziu sua atividade sexual? 1. Sim 2. Não

Você saberia dizer se seu parceiro: 1. Tem outras parceiras 2. Usa drogas 3. Já esteve preso 4. História de DST 5. É HIV positivo

6. Outras _____

Você já fez o teste anti-HIV? 1. Sim 2. Não

Se sim, quando?

1. Por iniciativa própria
2. Durante uma hospitalização
3. Durante o pré-natal
4. Durante atendimento em clínica DST
5. Em outras circunstâncias

Você tem algum dos seguintes sintomas ?

1. Dor pélvica
2. Sangramentos genitais frequentes
3. Coceiras na vagina
4. Corrimentos
5. Adenopatia inguinal (inguas na virilha)
6. Ardência ao urinar
7. Ferida genital
8. Outras: _____

RESULTADOS EXAMES:

Citologia :

Colposcopia :

Biópsia de colo:

Pesquisa Chlamydia trachomatis:

Pesquisa gonorreia

Pesquisa HPV:

Observações:

ANEXO D – Parecer do CEP para pesquisa em mulheres residentes em comunidades quilombolas

CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Prevenção de câncer de colo uterino em mulheres de comunidades quilombolas no Espírito Santo

Pesquisador: Angelica Espinosa Barbosa Miranda

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 44205714.1.0000.5080

Instituição Proponente: Centro de Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.308.539

Apresentação do Projeto:

Os quilombolas constituem cerca de 100 comunidades em todo o Estado do Espírito Santo, 35 delas localizadas no Norte do estado, nos municípios de São Mateus e Conceição da Barra, com cerca de 1.300 famílias. Além de educação e trabalho, a saúde destas populações, em especial no que diz respeito às doenças preveníveis, emerge como um grande problema, visto que eles possuem um acesso dificultado aos serviços de saúde e exposição a vários fatores e risco social, portanto um risco aumentado de câncer de colo uterino.

Será realizado um estudo de corte transversal em mulheres residentes nas comunidades quilombolas dos Municípios de São Mateus e Conceição da Barra, Espírito Santo. Uma entrevista face-a-face com duração de 20 minutos, será realizada utilizando um questionário padronizado contendo dados sócio-demográficos, epidemiológicos e clínicos. Será realizado exame ginecológico para coleta de citologia cervical de acordo com as normas do Ministério da Saúde. Amostras para pesquisa de outras DST serão coletadas seguindo protocolo específico

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

VITÓRIA, 04 de Novembro de 2015

Assinado por:
Cynthia Furst Leroy Gomes Bueloni
(Coordenador)

ANEXO E - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para pesquisa em mulheres HIV-positivas

Termo de Consentimento

Você está sendo convidada a participar do projeto “Prevalência e fatores de risco para *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* em mulheres vivendo com HIV no Brasil”. Este projeto é confidencial e suas respostas serão mantidas no anonimato.

Sua participação não é obrigatória e a qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua participação será de grande importância, pois permitirá uma avaliação de alguns problemas comuns entre as mulheres infectadas pelo HIV, como comportamentos de risco para DST/AIDS e a frequência de infecções ginecológicas, permitindo assim a elaboração de estratégias de prevenção e assistência que possam melhorar a qualidade de vida.

Se você concordar em participar neste estudo, você irá responder a um questionário e durante exame ginecológico será coletada secreção o colo do útero para realização de teste diagnóstico para infecções ginecológicas. Você receberá o resultado do exame, tratamento para infecção diagnosticada e aconselhamento sobre contracepção, prevenção de doenças sexualmente transmissíveis e gravidez.

Não haverá nenhum risco envolvendo as participantes, assim como não haverá custos ou pagamentos pela aceitação em participar.

As informações obtidas por meio de dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar a sua identificação.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento. Dra Angelica Espinosa Miranda CCS/UFES – Av. Marechal Campos, 1468 Vitória-ES – (27) 3335-7225.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Assinatura

ANEXO F – Questionário Estruturado aplicado a mulheres HIV-positivas

Questionário Estruturado

Data:

Iniciais:

Número do prontuário:

Estado/Município de Residência:

Naturalidade:

Data de nasc:

Idade? |_|_| anos

Escolaridade (em anos): _____ Opção sexual:

Qual é seu estado marital?

1. Solteiro(a) 2. Casado(a)/Vive junto maritalmente 3. Separado(a) 4. Viúvo(a)

Profissão: _____

Renda familiar: 1. Até 1 salário mínimo 2. De 1 a 3 SM 3. De 3,1 a 5 SM 4. Mais de 5

Número de pessoas que habitam em sua casa? _____

USO DE CIGARROS E DROGAS

Você fuma? 1. sim 2. Não Quantos cigarros?

1. Irregularmente, de tempo em tempo

2. Menos de 5 cigarros por dia

3. De 5 a 20 cigarros por dia

4. Mais de de 20 cigarros por dia

Se não, você já fumou?

1. Sim, 1 ou 2 vezes

2. Sim, regularmente

3. Não, nunca

Durante a semana que passou, você bebeu alguma bebida alcoólica?

1. Não

2. Uma vez

3. Várias vezes

4. Ficou bêbada

Você utiliza algum medicamento do tipo?

1. Para ansiedade e stress

2. Antidepressivos

3. Não

Se sim, qual?

Você já utilizou algum outro tipo de droga?

1. Não

2. Cola, éter

3. Cocaína

4. Crack

5. Remédios

6. Outras _____

Você já utizou droga injetável?

1. Sim

2. Não

3. NR

INFORMAÇÃO CONTRACEPTIVA

Você utiliza algum método contraceptivo?

1. Pilula

2. Preservativo

3. DIU

4. Muco cervical/billing

5. Temperatura

6. Tabela

7. Diafragma

8. Pilula do dia seguinte

9. Preservativo feminino

10. Não

Você e seu parceiro(a) utilizam preservativos? 1. Sim 2. Não

Se sim, com que frequencia vocês fazem uso do preservativo?

1. sempre

2. Às vezes

3. Raramente

4. Nunca

HISTORIA SEXUAL E REPRODUTIVA

Qual era sua idade quando você teve a primeira relação sexual? |_|_| anos

Qual era a idade de seu parceiro/a? |_|_| anos

Você tem ou já teve relação sexual anal? 1. Sim 2. Não 3. NR

Você já teve relação sexual com outra mulher? 1. Sim 2. Não 3. NR

Em média, quantas relações você tem (ou tinha) por semana? |_|_|_|

Quantos parceiros sexuais masculinos você já teve na vida? |_|_|_|

Quantos parceiros sexuais masculinos você teve nos últimos 12 meses? |_|_|_|

Você já engravidou?

1. Nunca 2. Uma vez 3. Várias vezes 4. Não se aplica

Se sim, qual era sua idade na primeira gravidez? |_|_| anos

Número filhos () Abortos espontâneos () Abortos provocados ()

Você está grávida? 1. sim 2. Não

SAUDE, DST E AIDS

Qual foi a última vez que você fez exame ginecológico (preventivo)?

Você sabe dizer se você já teve alguma doença transmitida sexualmente? 1. Sim 2. Não

Se sim, qual? _____ -

Como você descobriu essa doença/infecção?

1. Seu parceiro lhe disse que estava infectado
2. Você apresentou sintomas que a levaram procurar um serviço de saúde
3. Durante uma consulta de rotina ou por outro motivo

Na ocasião dessa doença você procurou

1. Ninguém 2. Um médico/ Unidade do PSF 3. Uma farmácia 4. Serviço de DST

Você avisou a seu parceiro que você tinha uma DST? 1. Sim 2. Não

Após o diagnóstico da DST você utilizou mais frequentemente o preservativo?

1. Sim 2. Não

Após o diagnóstico da DST você reduziu sua atividade sexual? 1. Sim 2. Não

Você saberia dizer se seu parceiro : 1. Tem outras parceiras 2. Usa drogas

3. Já esteve preso 4. História de DST 5. É HIV positivo

6. Outras _____

Quando você recebeu o Diagnóstico de HIV?

Faz uso de TARV?

Quais medicamentos?

Parceiro HIV positivo?

Você tem algum dos seguintes sintomas?

1. Dor pélvica 2. Sangramentos genitais frequentes 3. Coceiras
4. Corrimentos 5. Adenopatia inguinal (inguas na virilha) 6. Ardência ao urinar
7. Ferida genital 8. Outras:

No exame clínico foi identificado:

1. Dor pélvica ao toque 2. Sangramentos genitais 3. Hiperemia e/ou escoriações
4. Fluxo vaginal não fisiológico 5. Adenopatia inguinal 6. SSecreção cervical

7. Úlcera genital 8. Outras:

RESULTADOS EXAMES:

Carga viral:

Dosagem de CD4:

Pesquisa para Chlamydia:

Pesquisa para gonorreia

Pesquisa para HPV

Citologia:

Colposcopia:

Biópsia de colo:

Observações:

ANEXO G – Parecer do CEP para pesquisa em mulheres HIV-positivas

UFES - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO ESPÍRITO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Variantes de HPV16 e carga viral dos HR-HPV presentes na vacina nonavalente em mulheres soropositivas para HIV

Pesquisador: Liliana Cruz Spano

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 79402317.0.0000.5060

Instituição Proponente: Centro de Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.445.988

Apresentação do Projeto:

Segundo a pesquisadora responsável este projeto trata-se da análise de "informações de prevalência do HPV, variantes de HPV16 e carga viral dos HR-HPVs que permitirão avaliar possíveis marcadores para risco de lesões de alto grau (HSIL) em mulheres soropositivas para HIV."

Objetivo da Pesquisa:

Segundo a pesquisadora responsável o Objetivo Primário é "Identificar genótipos de HPV, variantes de HPV16 e carga viral de HR-HPV dos tipos presentes na vacina nonavalente em amostras cervicais de mulheres soropositivas para HIV de diferentes estados do Brasil.

Objetivo Secundário:

- Identificar os tipos de HPV encontrados em espécimes cervicais de mulheres soropositivas para HIV provenientes de oito estados brasileiros;
- Descrever as variantes de HPV16;
- Determinar a carga viral dos HR-HPVs presentes na vacina nonavalente (HPV16, 18, 31, 33, 45, 52, 58);
- Relacionar as variantes de HPV16 e a carga viral de HR-HPV com lesões de colo uterino."

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

VITÓRIA, 18 de Dezembro de 2017

Assinado por:

Maria Helena Monteiro de Barros Miotto
(Coordenador)