

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

Adriana Tonani de Mattos

**Genotipagem de HPV proveniente de mulheres
soropositivas e soronegativas para HIV
atendidas no Centro de Referência em DST/AIDS
em Vitória - ES**

VITÓRIA
2010

ADRIANA TONANI DE MATTOS

**Genotipagem de HPV proveniente de mulheres
soropositivas e soronegativas para HIV
atendidas no Centro de Referência em DST/AIDS
em Vitória - ES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências – Patologia Geral das Doenças Infecciosas.

Orientadora: Dr^a. Liliana Cruz Spano.

Co-orientadora: Dr^a. Angélica Espinosa Miranda.

VITÓRIA

2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A mestranda ADRIANA TONANI DE MATTOS, apresentou dissertação intitulada: "GENOTIPAGEM DE HPV PROVENIENTE DE MULHERES SOROPOSITIVAS E SORONEGATIVAS PARA HIV ATENDIDAS NO CENTRO DE REFERÊNCIA EM DST/AIDS EM VITÓRIA - ES" em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de **Mestre 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, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora da Dissertação decidiu, **APROVAR SEM RESTRIÇÕES**, a dissertação e habilitar a farmacêutica ADRIANA TONANI DE MATTOS, a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória-ES, 15 de dezembro de 2010

Prof. Dra. Silvia Maria Baeta Cavalcanti
(Membro Externo)

Prof. Dra. Rita Elizabeth Checon de Freitas Silva
(Membro Interno)

Prof. Dra. Liliana Cruz Spano
(Orientadora)

Prof. Dra. Angélica Espinosa Barbosa Miranda
(Co-Orientadora)

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

M444g Mattos, Adriana Tonani de, 1985-
Genotipagem de HPV proveniente de mulheres soropositivas e soronegativas para HIV atendidas no Centro de Referência em DST/AIDS em Vitória - ES / Adriana Tonani de Mattos. – 2010.
143 f. : il.

Orientadora: Liliana Cruz Spano.

Co-Orientadora: Angélica Espinosa Barbosa Miranda.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Vírus do papiloma. 2. HIV (Vírus). 3. Polimorfismo de Fragmento de Restrição. I. Spano, Liliana Cruz. II. Miranda, Angélica Espinosa Barbosa. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

Aos meus amados pais, Derci e Arnaldo,
meus grandes exemplos de vida, que mesmo
a distância, com muito amor e carinho, me
deram apoio e suporte para eu conquistar
essa vitória

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e presença constantes.

À minha orientadora, Dra Liliana Cruz Spano, pela oportunidade, exemplo, aprendizado e confiança desde a graduação até o mestrado.

À minha co-orientadora e coordenadora do Programa de Pós Graduação em Doenças Infecciosas, Dra Angélica Miranda, pelo aprendizado, incentivo e apoio.

À Dra. Rita Elizabeth Checon de Freitas Silva que, sempre atenciosa, dividiu o laboratório durante muito tempo com todos os estagiários e mestrandos, pela presença na banca e importante colaboração.

À Dra Silvia Maria Baeta Cavalcanti, por aceitar fazer parte da banca examinadora e por toda contribuição.

À Dra Bettina Lima, por ter coletado as amostras utilizadas no estudo.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas por contribuírem para minha formação.

Aos colegas de turma e do NDI, por toda força que sempre me deram e por tornarem não somente os momentos de trabalho, mas também os de lazer sempre mais alegres.

À amiga Luciana Bueno de Freitas por realizar parte da metodologia deste trabalho e por compartilhar comigo o conhecimento e experiência no laboratório, além de conversas e momentos agradáveis.

À minha irmã, Renata Tonani de Mattos, por todo o incentivo, companhia e amizade.

Ao Lorenzo Lyrio Stringari, meu amor, pela dedicação, amizade, companheirismo e compreensão, que tornaram meus dias mais agradáveis e por me emprestar suas palavras tão reconfortantes, sempre presentes nos momentos difíceis.

À minha segunda família, Wayna Sad Lyrio Stringari, Vitor Manoel Stringari e Lorayna Lyrio Stringari, por todo o apoio, acolhimento e incentivo.

A todos os amigos e parentes que torceram por meu sucesso.

À Facitec pelo financiamento do projeto e à FAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

Os papilomavírus humanos (HPV) são vírus epiteliotrópicos que infectam tecido cutâneo ou mucoso e estão relacionados com desenvolvimento de lesões que, no trato genital, variam de verrugas ao câncer cervical invasivo. Estas lesões são causadas por diferentes tipos de HPV, que são classificados em baixo e alto risco conforme sua associação com câncer cervical. Sabe-se que mulheres soropositivas para HIV são mais acometidas por infecções por HPV e estão mais propensas ao desenvolvimento de câncer cervical. O objetivo desse estudo foi avaliar a frequência de tipos de HPV em mulheres soropositivas e soronegativas para HIV. Para isso foram analisadas amostras de escovado cervical, que faziam parte do banco de amostras do Laboratório de Virologia, de mulheres conhecidamente positivas para HPV (n=87) atendidas no Centro de Referência DST/AIDS, em Vitória-ES, no período de março a dezembro de 2006. O DNA das amostras foi extraído utilizando kit comercial QIAamp[®] DNA Mini Kit ou através do método de isotiocinonato de guanidina e sílica. DNA do HPV foi amplificado por PCR utilizando os iniciadores degenerados MY09/MY11 ou PGMY09/PGM11 biotinilados e a genotipagem foi realizada por *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) ou por *Reverse Line Blot* (RLB), respectivamente. Do total de amostras, 97,7% foram genotipadas e 31 tipos distintos detectados: 6, 11, 13, 16, 18, 26, 31, 31b, 32, 33, 34, 35, 42, 44, 51, 52, 53, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 68, 71, 81, 82, 83 e 84. O tipo mais prevalente foi o HPV16, tanto nas mulheres soropositivas quanto nas soronegativas para HIV, seguido pelos tipos 6, 53 e 11. O tipo 13, incomum em amostras cervicais, foi observado nesse estudo, porém a quantidade de amostras não foi suficiente para a realização de seqüenciamento para a confirmação deste tipo viral. Os tipos oncogênicos foram mais comuns nas amostras de mulheres soropositivas para HIV, porém com número semelhante e o número de infecções múltiplas foi maior entre as mulheres HIV positivas. Este estudo revelou uma grande diversidade de tipos de HPV na região.

ABSTRACT

Human papillomaviruses (HPV) are epitheliotropic viruses that infect skin tissue or mucous membranes, closely related to development of lesions in the genital tract, ranging from warts to invasive cervical cancer. These injuries are caused by different types of HPV that are classified into low and high risk types according to the association with cervical cancer. HIV seropositive women are mostly affected by HPV and are more prone to develop cervical cancer. The aim of this study was to evaluate the frequency of HPV types in seropositive and seronegative women for HIV. Therefore, cervical samples, part of the human bank samples of the Virology Laboratory, were analysed from women known to be positive for HPV (n=87) attending the Reference Center STD / Aids Clinic in Vitória-ES, during March to December 2006. DNA was extracted by commercial kit QIAamp® DNA Mini Kit following manufacturer's instructions or by guanidine isothiocyanate and silica methodology. HPV DNA was amplified by PCR using degenerate MY09/MY11 or biotinylated PGMY09/PGMY11 primers and genotyped by restriction fragment length polymorphism (RFLP) or by reverse linear blot (RLB), respectively. Out of the total of the samples, 97.7% were genotyped and 31 distinct types were detected: 6, 11, 13, 16, 18, 26, 31, 31b, 32, 33, 34, 35, 42, 44, 51, 52, 53, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 68, 71, 81, 82, 83 and 84. The most prevalent type was HPV16, either in seronegative women as in seropositive women for HIV, followed by types 6, 53 and 11. HPV type 13, unusual in cervical samples, was observed in this study, but the amount of samples was not sufficient to confirm this viral type by sequencing. Oncogenics types were more common in samples of HIV seropositive women, however in similar number, and number of multiple infections was higher in HIV positive women. This study revealed a greater diversity of HPV types in this region.

LISTA DE SIGLAS

AIDS - *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASCUS: Atipias de Células Escamosas de Significado Indeterminado.

BM – Banho-Maria

BPV- *Bovine papillomavirus* (Papilomavirus Bovino)

CC – Câncer Cervical

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention* (Centro para Controle e Prevenção de Doenças)

COPV - *Canine Oral papillomavirus* (Papilomavírus Oral Canino)

DEPC- Dietilpirocarbonato

CR-DST/AIDS – Centro de Referência em DST e AIDS

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

DST – Doenças Sexualmente Transmissíveis

E – *Early* (Precoce)

GSK - GlaxoSmithKline

HIV – *Human Immunodeficiency virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

HPV - *Human papillomavirus* (vírus do papiloma humano)

HDAC – Histona Desacetilase

HR – *High Risk* (Alto Risco)

ICTV - *International Committee of Taxonomy of Viruses* (Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus)

L – *Late* (Tardio)

LA – *Linear Array* (Arranjo em Linha)

LACEN – Laboratório Central

LBA – *Line Blott Assay* (Ensaio de Hibridização em Linha)

LiPA – *Line Probe* (Sonda em Linha)

LCR - *Long Control Region* (Região Longa de Controle)

LR – *Low Risk* (Baixo Risco)

MSD - Merck Sharp & Dohme

NK – *Natural Killer* (Matadoras Naturais)

ORF - *Open Reading Frame* (Região Aberta de Leitura)

pA – Sítios de Poliadenilação

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia pela Polimerase)

pmol – Picomolar

PV - *Papillomavirus*

pRb – Proteína do Retinoblastoma

p53 – Proteína supressora de tumor p53

RNA - *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucléico)

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição)

RLB – *Reverse Line Blotting* (Hibridização Reversa em Linha)

LI – Lesão Intraepitelial Escamosa

TA – Temperatura Ambiente

TAP1- Transportador Associado a Proteína Antígeno 1

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

uds – Unidades

μL – Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árvore filogenética dos papilomavírus.....	- 24 -
Figura 2. Fotomicrografia eletrônica do HPV.....	- 25 -
Figura 3. Genoma do HPV.....	- 26 -
Figura 4. Expressão de proteínas do HPV em epitélio estratificado..	- 28 -
Figura 5. Vias de endocitose do HPV.....	- 31 -
Figura 6. Expressão de proteínas do HPV e replicação viral em epitélio estratificado com lesão.....	- 33 -
Figura 7. Esquema de extração do DNA através do <i>kit</i> de extração QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN).....	- 55 -
Figura 8. Produto de amplificação do gene <i>β-globina</i>	- 68 -
Figura 9. Produto de amplificação do DNA do HPV..	- 69 -
Figura 10. Eletroforese dos produtos de digestão após tratamento com enzimas de restrição para alguns dos tipos detectados	- 77 -
Figura 11. Placa radiográfica correspondente à membrana de Hibridização Reversa em Linha demonstrando os tipos de HPV detectados.....	- 78 -

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Frequência dos tipos de alto e baixo risco de HPV detectados em mulheres soropositivas e soronegativas para HIV. - 71 -

Gráfico 2. Frequência dos tipos de alto e baixo risco de HPV em mulheres soropositivas e mulheres soronegativas para HIV separadamente. - 72 -

Gráfico 3. Frequência dos tipos de HPV identificados em mulheres soropositivas para HIV. - 72 -

Gráfico 4. Frequência dos tipos de HPV em mulheres soronegativas para HIV. - 73 -

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação dos tipos de HPV em baixo e alto risco.....	- 24 -
Quadro 2. Proteínas do HPV e suas funções.....	- 27 -
Quadro 3. Tipos de HPV e apresentação clínica.....	- 38 -
Quadro 4. Modulação dos aspectos imunes pela infecção por HPV	- 41 -
Quadro 5. Vacinas para HPV.....	- 48 -
Quadro 6. Iniciadores para reação de PCR do gene β -globina	- 56 -
Quadro 7. Iniciadores consensuais MY09/11.....	- 57 -
Quadro 8. Iniciadores consensuais PGMY09/11.....	- 58 -
Quadro 9. Mistura para PCR para o gene β globina e PCR para HPV com iniciadores MY09/11 e PGMY09/11.....	- 59 -
Quadro 10. Programas de amplificação para o gene β -globina e HPV.....	- 60 -
Quadro 11. Sondas tipo-específicas	- 62 -
Quadro 12. Distribuição dos tipos de HPV em coinfeção	- 76 -

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre diversos testes para detecção de HPV.....- 45 -

Tabela 2. Frequência em número absoluto dos tipos de HPV.- 70 -

Tabela 3. Frequência dos tipos de HPV em mulheres soropositivas e soronegativas para HIV.- 74 -

Tabela 4. Descrição das alterações citológicas, tipos de HPV presentes com identificação deles em baixo (LR) e alto risco (HR) e perfil sorológico para HIV.- 79 -

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	- 20 -
2 REVISÃO DE LITERATURA	- 23 -
2.1 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV).....	- 23 -
2.1.1 Classificação e Descrição	- 23 -
2.1.2 Estrutura.....	- 25 -
2.1.4 Epidemiologia e Implicações Clínicas	- 36 -
2.1.5 Resposta Imune ao HPV	- 39 -
2.1.6 Diagnóstico Laboratorial	- 42 -
2.1.7 Vacina	- 47 -
2.2 INTERAÇÃO HPV-HIV	- 48 -
3 OBJETIVOS	- 51 -
3.1 OBJETIVO GERAL	- 51 -
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	- 51 -
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	- 53 -
4.1 TIPO DE ESTUDO.....	- 53 -
4.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	- 53 -
4.3 ESPÉCIME	- 53 -
4.4 ASPECTOS ÉTICOS.....	- 53 -
4.5 EXTRAÇÃO DO DNA	- 54 -
4.5.1 Extração do DNA por QIAamp® DNA Mini Kit™.....	- 54 -
4.5.2 Extração do DNA através de isotiocianato de guanidina e adsorção em partículas de sílica	- 55 -
4.6 DETECÇÃO DO GENE <i>β-GLOBINA</i>	- 56 -
4.7 AMPLIFICAÇÃO DO DNA DO HPV	- 57 -
4.8 QUANTIFICAÇÃO DO DNA	- 60 -
4.9 GENOTIPAGEM DO HPV	- 60 -
4.9.1 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)	- 60 -
4.9.2 Hibridização Reversa em Linha (RLB)	- 61 -
4.10 REAGENTES E SOLUÇÕES UTILIZADOS	- 64 -
4.10.1 TBE 10X (pH 8,4).....	- 64 -
4.10.2 Gel agarose 1,5%.....	- 64 -
4.10.3 Tampão 4x “Lower Tris” pH 8.8.....	- 64 -
4.10.4 Acrilamida 50%/ Bisacrilamida 1,3%.....	- 64 -

4.10.5 Persulfato de Amônio 2%.....	- 65 -
4.10.6 Solução fixadora	- 65 -
4.10.7 Solução corante Nitrato de Prata.....	- 65 -
4.10.8 Solução Reveladora.....	- 65 -
4.10.9 Solução de Interrupção	- 65 -
4.10.10 Tampão L2	- 65 -
4.10.11 Tampão L6.....	- 66 -
4.10.12 Tampão SSPE 2x (pH 7,4).....	- 66 -
4.10.13 Água DEPC.....	- 66 -
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	- 66 -
5 RESULTADOS	- 68 -
5.1 PCR	- 68 -
5.1.1 Detecção do gene β -GLOBINA	- 68 -
5.1.2 Amplificação do DNA do HPV por PCR.....	- 69 -
5.2 GENOTIPAGEM DO HPV	- 69 -
5.3 CITOLOGIA.....	- 79 -
6 DISCUSSÃO.....	- 81 -
7 CONCLUSÕES	- 90 -
8 PERSPECTIVAS.....	- 92 -
9 REFERÊNCIAS.....	- 94 -
10 ANEXOS.....	- 122 -

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os *Papillomavirus humano* (HPV) estão entre os agentes virais mais comumente transmitidos sexualmente (Bauer et al., 1991). Isto significa que sua prevalência está diretamente associada à promiscuidade sexual, ao número e à troca constante de parceiros durante a vida e à história de outras doenças sexualmente transmissíveis. São ainda responsáveis pela segunda causa de morte de mulheres por câncer, estando associado com câncer cervical (CC) em 99,7% dos casos (Bosch et al., 1995; Walboomers et al., 1999).

Existem aproximadamente 100 tipos de HPV, que são classificados em alto e baixo risco, conforme a capacidade de progressão para lesões malignas (Muñoz et al., 2003; de Villiers et al., 2004).

Após a infecção cervical pelo HPV, o genoma viral pode persistir em células basais do epitélio estratificado por período variado de tempo e induzir lesões. Estas lesões, por sua vez, podem permanecer durante meses a anos e então regredir espontaneamente ou, no caso da infecção pelos tipos de HPV de alto risco, evoluir para lesão intraepitelial escamosa (LIE – Lesão Intraepitelial Escamosa) de baixo e de alto grau e por sua vez, progredir lentamente para o CC (Lowy & Howley, 2001). Além da infecção por tipos oncogênicos de HPV, outros fatores podem estar associados com a transição de infecção cervical para câncer, tais como: uso prolongado de contraceptivos orais, hábito de fumar e outras doenças sexualmente transmissíveis (DST), como herpes simplex tipo 2, *Chlamydia trachomatis* e, especialmente, infecção pelo HIV (Hankins et al., 1999; Guimarães et al., 2000; Norris et al., 2002; Ferenczy et al., 2003; Queiroz et al., 2004). Em relação ao HPV o risco é relativo ao tipo infeccioso, às suas variantes, à carga viral, à persistência e integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira (Guimarães et al., 2000; Norris et al., 2002; Queiroz et al., 2004).

Dessa forma, a caracterização dos tipos de HPV infecciosos faz-se necessária como prognóstico e base para tratamento, além de ser um preditivo da eficácia das vacinas bivalente e quadrivalente liberadas para comercialização,

principalmente em Vitória, onde o presente estudo é um dos poucos a descrever os tipos de HPV (Freitas et al., 2009; Lima et al., 2009).

A partir dos anos 90, com o advento da biologia molecular, várias técnicas têm sido desenvolvidas para detecção e determinação dos tipos de HPV. Para genotipagem do HPV, os principais métodos são: i) PCR, que pode ser utilizada tanto para detecção quanto para determinação dos tipos específicos (Cuzik et al., 1994; Oliveira et al., 2006); ii) Ensaio de Captura Híbrida, que permite a distinção em tipos de alto e baixo risco, mas não permite a identificação deles, além de ser de custo mais elevado (Sandri et al., 2006); iii) RFLP, metodologia que utiliza a digestão com enzimas de restrição do DNA do HPV amplificado por PCR e permite determinação de 44 tipos de HPV (Bernard et al., 1994); iv) RLB, capaz de testar 32 tipos de HPV distintos e até 42 amostras ao mesmo tempo. As duas últimas metodologias foram escolhidas para este estudo, por serem capazes de determinar o maior número de genotipos com apenas uma amplificação.

Dados sobre a ocorrência dos tipos de HPV encontrados em pacientes soropositivas e soronegativas para HIV é ferramenta importante no planejamento das medidas de prevenção e de assistência à saúde da mulher. Além disso, tal caracterização é importante na determinação do risco de evolução da lesão para LIE e para CC e pode definir o perfil geográfico desses tipos estabelecendo a probabilidade de eficácia das vacinas comercializadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

2.1.1 Classificação e Descrição

Os papilomavírus pertencem à família *Papillomaviridae*, onde estão descritos 16 gêneros, sendo os vírus que infectam humanos, os HPV (*Human Papillomavirus*), pertencentes aos gêneros *Alphapapillomavirus*, *Bethapapillomavirus*, *Gamapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* e *Nupapillomavirus* (Figura 1).

Noventa e dois diferentes tipos de HPVs foram classificados pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV, 2009). Como o HPV é dificilmente isolado em sistemas usuais de cultivo celular, a classificação em tipos é determinada pela análise genômica, o que distingue o HPV em genótipos e não em sorotipos. Conforme critérios adotados pelo Comitê de Nomenclatura dos Papilomavírus, a diferenciação em tipos, subtipos e variantes de papilomavírus (PV) é baseada na seqüência genômica de L1, que difere de um para o outro em, no mínimo 10%, 2- 10% e no máximo 2%, respectivamente (de Villiers et al., 2004).

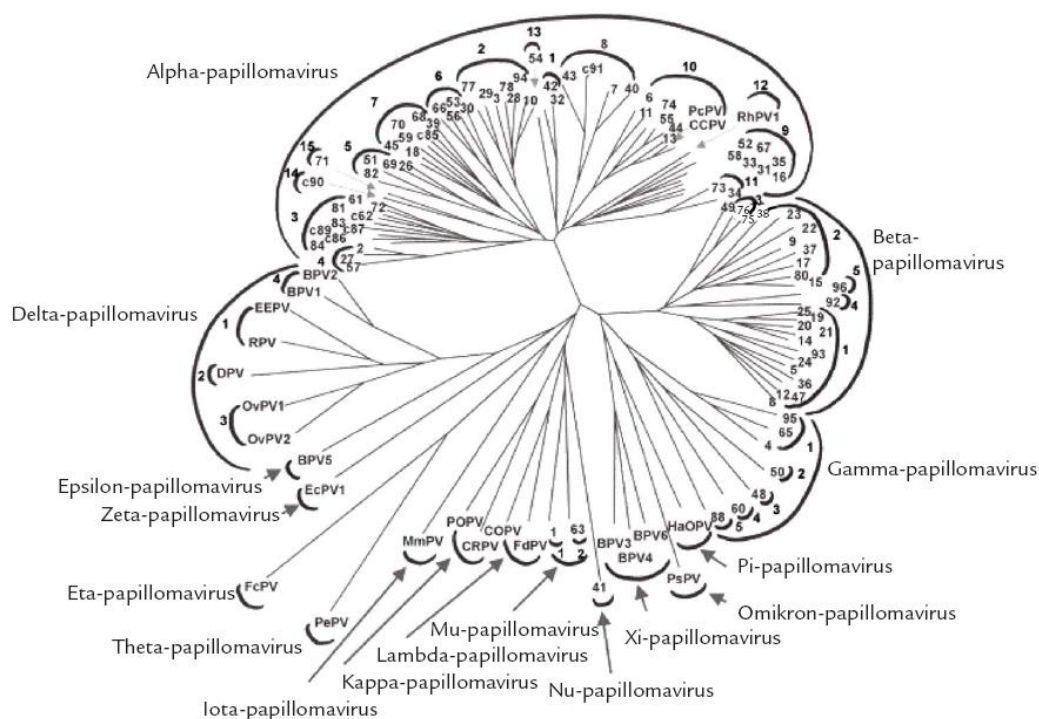


Figura 1. Árvore filogenética dos papilomavírus. Estão demonstrados os gêneros e seus respectivos tipos, humanos e não humanos. Fonte: de Villiers et al., 2004.

Os gêneros de HPV podem ser divididos de acordo com o tropismo celular: os vírus pertencentes ao gênero *Alphapapillomavirus* possuem tropismo pelo epitélio mucoso, enquanto os do gênero *Bethapapillomavirus* infectam células epiteliais cutâneas (de Villiers et al., 2004).

Os HPV são ainda classificados, conforme o risco de levarem à progressão para invasão/câncer, em baixo e alto risco (Quadro 1) (Muñoz et al., 2003).

Quadro 1. Classificação dos tipos de HPV em baixo e alto risco.

RISCO	Tipo de HPV
Baixo	6, 11, 13, 32, 34, 40, 42, 44, 54, 55, 57, 61, 62, 64, 67, 69, 70, 71, 72, 81, 83, 84, CP6108
Alto	16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82

2.1.2 Estrutura

Os PV são vírus pequenos não envelopados, com capsídeo icosaédrico de 52 a 55 nm de diâmetro composto por 72 capsômeros (Baker et al., 1991; Howley e Lowy, 2001) (Figura 2) e genoma constituído por DNA circular de fita dupla (DNA_{df}) de aproximadamente 8 kb (Howley & Lowy, 2007).

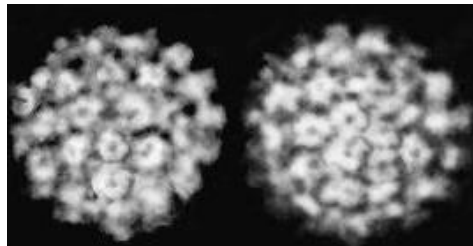


Figura 2. Fotomicrografia eletrônica do HPV. Estrutura do papilomavírus humano observado ao microscópio eletrônico de transmissão. Fonte: CDC – NPIN (2010).

2.1.2.1 Genoma

Todos os PV contem genoma de DNA circular de dupla fita com aproximadamente 8.000 pares de bases, que podem ser divididos em três regiões: precoce (E- *Early*), tardia (L- *Late*) e região LCR (*Long Control Region*) (Figura 3A) (Cheah & Looi, 1998). As três regiões em todos os papilomavírus são separadas por dois sítios de poliadenilação (pA): pA precoce (A_E) e pA tardio (A_L) (Zheng & Baker, 2006).

A região precoce do genoma dos PV ocupa mais de 50% do genoma viral a partir da sua metade 5' e codifica seis ORFs (regiões de leitura aberta) comuns (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) (Danos et al., 1982), que dão origem às suas respectivas proteínas. Duas outras ORFs, E3 e E8, foram também inicialmente atribuídas a essa região, mas apenas a ORF E8 em BPV1 e HPV31 codificam proteína, uma proteína de fusão E8^{E2C}, que funciona como regulador negativo de replicação e transcrição viral (Lambert et al., 1987; Hubbert et al., 1988; Choe et al., 1989; Stubenrauch et al., 2000, 2001).

A região tardia ocupa cerca de 40% do genoma total do HPV e engloba as ORFs L1 e L2 que dão origem à proteína principal, L1, e à proteína L2. A região LCR contém cerca de 850 pb e não tem função codificante de proteína, mas contém a origem da replicação, bem como locais de ligação para fatores de transcrição que são importantes na regulação da transcrição iniciada pela RNA polimerase II dos promotores precoces e tardios (Baker, 2006).

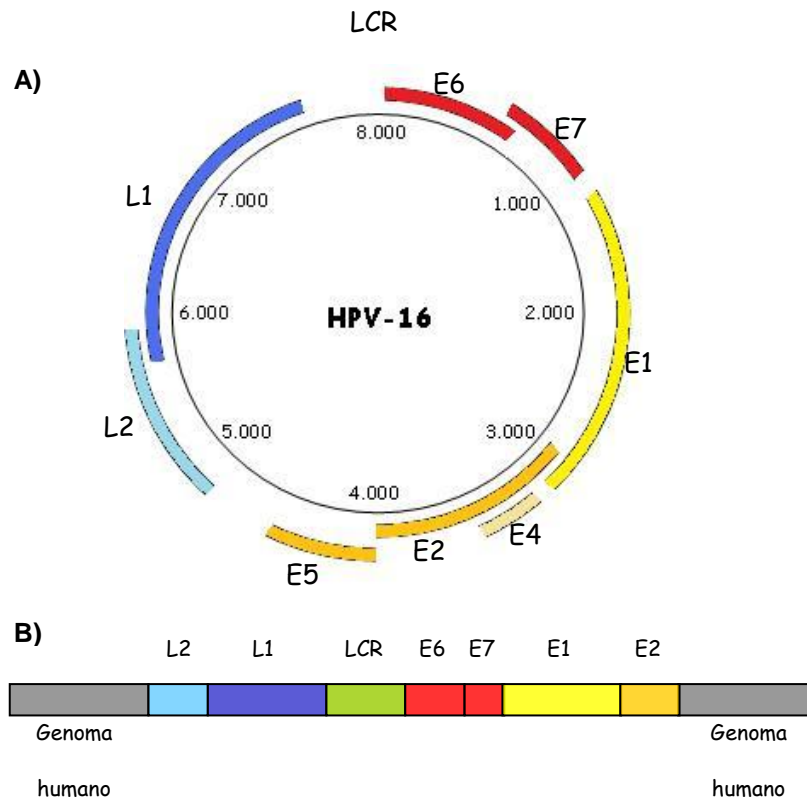


Figura 3. Genoma do HPV. Esquema do genoma circular, epissômico (A) e linear, integrado (B) com as posições relativas dos genes *E* e *L*. Fonte: Gross & Barrasso (1999), adaptado.

A organização genômica é similar entre os diversos tipos de PV. As ORFs são localizadas em apenas uma das fitas de DNA, ou seja, todos os genes estão localizados nesta fita e estudos de transcrição demonstram que apenas uma delas serve de molde para a síntese do RNA mensageiro (Howley & Lowy, 2007).

Como citado anteriormente, o DNA do HPV se apresenta na forma circular (epissomal), entretanto, em alguns tipos de infecções, o DNA do vírus se integra ao cromossoma do hospedeiro, tornando-se linear (Figura 3B). Durante a integração, ocorre ruptura da região *E1-E2*, comprometendo o controle gênico que *E2* exerce nos oncogenes *E6* e *E7* (Syrjänen & Syrjänen, 2000).

2.1.2.2 Proteínas

As proteínas do HPV recebem o mesmo nome de seus genes: proteínas E, não-estruturais (E1-E7) e proteínas L, estruturais (L1 e L2). Algumas das funções desempenhadas pelas proteínas virais podem ser observadas no Quadro 2.

Quadro 2. Proteínas do HPV e suas funções. Fonte: Syrjänen & Syrjänen (2000), adaptado.

Proteínas		Função
Precoces	E1	Replicação viral, manutenção do epissomo.
	E2	Replicação e transcrição viral, transformação.
	E4	Ligação às citoqueratinas.
	E5	Afeta receptor para fator de crescimento epidermal.
	E6	Proteína transformante, se liga à p53.
	E7	Proteína transformante, se liga à pRb.
Tardias	L1	Principal proteína do capsídeo, epítipo neutralizante.
	L2	Menor proteína do capsídeo, organização.

A expressão das proteínas virais é fortemente regulada e dependente da diferenciação celular (Laimins, 1996). As proteínas E são expressas precocemente no ciclo replicativo do HPV, enquanto que as proteínas L são expressas apenas nos estágios tardios da replicação, nas células mais diferenciadas do epitélio, onde ocorre a montagem dos vírions (Figura 4).

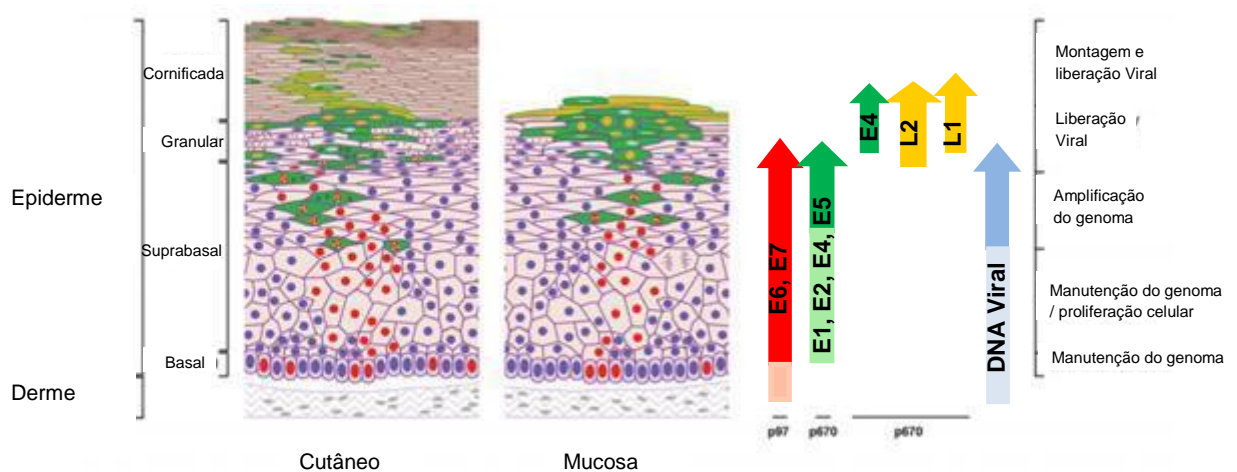


Figura 4. Expressão de proteínas do HPV em epitélio estratificado. Expressão gênica do HPV dependente da estratificação do epitélio. Fonte: Doorbar (2006), adaptado.

2.1.2.2.1 Proteínas Estruturais

O capsídeo dos PV consiste de duas proteínas estruturais: (i) proteína L1, a principal, de aproximadamente 54 kD, que representa cerca de 80% de toda proteína viral; (ii) proteína L2, que apresenta tamanho de 70 kd (Favre et al., 1975; Howley e Lowy, 2001). Apesar de não ser necessária para a ligação do vírions à célula hospedeira, L2 tem função na encapsidação do DNA dos PV no capsídeo viral e, assim, aumenta sua infecciosidade (Zhou et al., 1993).

2.1.3 Ciclo de Replicação

2.1.3.1 Adsorção

As células infectadas pelo HPV são as células basais do epitélio. Para que ocorra a infecção é condição necessária que o epitélio sofra micro-traumas para exposição das células basais (Stubenrauch & Laimins, 1999).

Os HPV apresentam tropismo específico por tecido epitelial escamoso, embora não seja determinado por receptores específicos para este tipo de tecido, visto que os vírions podem se ligar a uma grande variedade de tipos celulares, como

células neurais, fibroblastos e células epiteliais (Roden et al., 1994; Howley e Lowy, 2001).

O primeiro receptor celular identificado para o HPV foi a $\alpha 6$ integrina (Evander et al., 1997; McMillan et al., 1999; Yoon et al., 2001). A integrina é uma glicoproteína heterodimérica formada por subunidades α e β , envolvidas primariamente em interações célula-matriz e célula-célula e capaz de atuar como receptor viral para ligação inicial e/ou internalização (Evander et al., 1997). Até o momento 17 tipos de subunidades α e oito tipos de subunidades β são conhecidos e sabe-se que a subunidade $\alpha 6$ apresenta um papel importante já que anticorpos anti-integrina $\alpha 6$ bloqueiam a ligação desses vírus à célula hospedeira (Evander et al., 1997). A subunidade $\alpha 6$ se liga preferencialmente à $\beta 4$ nas células epiteliais (Giancotti et al., 1992) e o complexo $\alpha 6\beta 4$ é expresso exclusivamente na camada de células basais do epitélio escamoso estratificado (Kajiji et al., 1989).

Foi observado que os PV podem também se ligar ao sulfato de heparana e às glicosaminoglicanas da superfície celular dos queratinócitos, com papel crítico observado por: 1) a remoção do sulfato de heparana dos glicosaminoglicanos nos queratinócitos com heparinase resulta em diminuição de 80% a 90% da ligação das VLPs (*Virus Like Particles*) do HPV11 (Joyce et al., 1999); 2) a pseudo infecção por HPV16 e 33 foi inibida pela heparina, reduzida com o declínio da sulfatação da superfície e abolida por tratamento com heparinase (Giroglou et al., 2001). A ligação a essas moléculas permite que ocorra uma ligação inicial à célula hospedeira seguida de ligação ao receptor celular específico e internalização viral (Joyce et al., 1999; Howley e Lowy, 2001).

Além disso, estudos em culturas de células têm revelado que depois da ligação com sulfato de heparana das proteoglicanas na superfície das células, o capsídeo das partículas virais maduras dos PV passa por uma série de mudanças conformacionais antes de entrar na célula (Selinka et al., 2007; Day et al., 2008). Especificamente, a superfície de ligação durante a infecção de células em cultura é associada com a região N terminal de L2 tornando-se sensível à clivagem por uma proteína convertase, furina, e/ou a proproteína convertase PC5/6. Essa clivagem leva a exposição de um epítipo crítico entre

os aminoácidos 17 e 36, imediatamente abaixo do sítio de clivagem da furina-PC5/6, o que pode ser controlado por ligação de anticorpo a esse epítipo. A infecção das células de cultura requerem a clivagem de L2 pela furina-PC5/6 já que um inibidor de PC, que previne a clivagem, também previne a infecção (Richards et al., 2006; Day et al., 2008).

2.1.3.2 Internalização e Desnudamento

Estudos têm demonstrado que diferentes tipos de HPV apresentam diferentes mecanismos de entrada na célula, que incluem endocitose mediada por clatrina, endocitose caveolar e endocitose clatrina e cavéola-independente (Sapp & Bienkowska-Haba, 2009).

A endocitose mediada por clatrina é um dos principais mecanismos de entrada celular de vários vírus. A ligação de um ligante a um receptor específico resulta em agrupamento dos complexos ligante-receptor nos poços revestidos na membrana plasmática (Figura 5), que depois invagina e é desligada da membrana plasmática para formar vesículas intracelulares revestidas por clatrina. As moléculas internalizadas por este mecanismo experimentam um rápido declínio de pH (Sieczarski et al., 2002; Mudhakhir et al., 2009) que leva a uma mudança conformacional, resultando em escape do genoma ou do complexo genoma/L2 do endossomo (Figura 5) (Day et al., 2003).

A internalização caveolar, quando comparada com a mediada por clatrina é mais lenta; as vesículas formadas falham em se tornarem ácidas, não é um processo constitutivo (Sieczarski et al., 2002) e os caveossomos passam pelo aparelho de Golgi e/ou retículo endoplasmático (Figura 5) (Smith et al., 2008). Laniosz et al. (2008) observaram que o papilomavírus bovino (BPV) mesmo possuindo capacidade de internalização via endocitose clatrina dependente é incapaz de estabelecer infecção sem caveolina-1, sugerindo que este vírus utiliza a via caveolar após a internalização, onde a Rab 5 pode induzir ou ser envolvida nesse transporte do endossomo para o caveossomo (Figura 5).

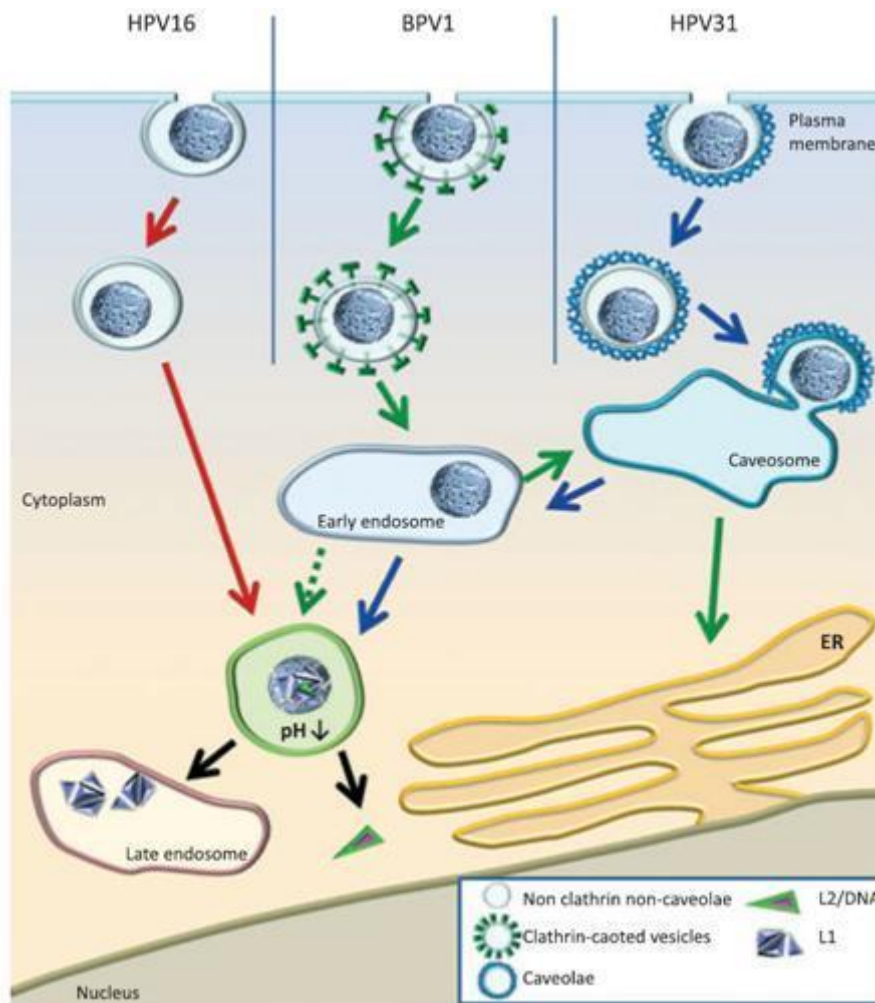


Figura 5. Vias de endocitose do HPV. Diagrama esquemático dos mecanismos de entrada propostos para vários tipos de HPV. HPV16 é endocitado via clatrina-caveolina independente, enquanto BPV1 e HPV31 entram via vesículas revestidas com clatrina e caveolina, respectivamente (Sapp & Bienkowska-Haba, 2009).

A endocitose clatrina caveolo-independente envolve microdomínios ricos em tetrasparina (TEMs) (Figura 5) (Spoden et al., 2008). As tetrasparinas são uma família conservada de proteínas com quatro domínios transmembrana, incluindo 32 membros em humanos (Hemler et al., 2003), que são capazes de interagir lateralmente entre si e com outras proteínas transmembrana para formar TEMs dentro das quais as tetrasparinas podem controlar e modular complicadas atividades de adesão, migração, e formação de sinapse, assim como endocitose e exocitose (Levy et al., 2005).

Após entrar na célula, no endossomo, ocorre a disponibilização do ácido nucléico que então, vai para o núcleo junto com a proteína L2 (Day et al., 2003). A proteína L2 pode auxiliar essa importação para a região perinuclear e para domínios celulares transcricionalmente ativos (Day et al., 2003). O transporte se dá pela interação dessa proteína com os microtúbulos via proteína dineína.

2.1.3.3 Expressão gênica

A replicação e a transcrição dos PV são difíceis de serem estudadas já que são fortemente reguladas pelo estado de diferenciação das células epiteliais escamosas (Dollard et al., 1992; Meyers et al., 1992; Barksdale e Baker, 1993).

Múltiplos promotores foram mostrados estar envolvidos na geração de RNAm a partir de HPV que infecta o trato genital (Howley e Lowy, 2001). Existe uma importante diferença na expressão de E6 e E7 entre os HPV de baixo e de alto risco. Para os HPV de alto risco, um único promotor direciona a síntese das proteínas E6 e E7. Por outro lado, os genes E6 e E7 dos HPV de baixo risco são expressos a partir de dois promotores independentes (Howley e Lowy, 2001). No início do ciclo viral, fatores celulares interagem com a LCR do HPV para iniciar a transcrição viral dos oncogenes *E6* e *E7*. As proteínas E6 e E7 expressas precocemente irão alterar o ciclo celular pela interação e inativação das proteínas supressoras de tumor p53 e pRb, respectivamente (Tommasino et al., 2003; Dimova & Dyson, 2005).

E1 e E2 são as próximas proteínas a serem sintetizadas. E2 bloqueia a transcrição precoce e permite ligação específica de E1 à origem de replicação em LCR, iniciando a replicação do genoma viral (Mohr et al., 1990; Thorner et al., 1993). Durante o processo de diferenciação do epitélio, nas camadas mais superficiais, outros genes são expressos a partir de promotores tardios (Wilson et al., 2005). Esses genes tardios específicos do processo de diferenciação incluem: E5 que apresenta capacidade transformante *in vitro* (Leechanachai et al., 1992; Straight et al., 1993) e papel na ativação de funções virais tardias por manter a capacidade proliferativa da célula e auxiliar na não diferenciação

delas (Fehrmann et al., 2003; Genther et al., 2003); E1^{E4} que induz colapso da rede de citoqueratina (Doorbar et al., 1986, 1991; Roberts et al., 1993) e; os genes do capsídeo L1 e L2. Neste estágio, vírions maduros já podem ser detectados na camada granular (Syrjänem & Syrjänem, 2000) (Figura 6).

Nas lesões intraepiteliais escamosas (LIE), ocorrem mudanças no padrão de expressão das proteínas, assim como na replicação do HPV, que é tanto menor quanto maior o nível de gravidade das lesões (Doorbar, 2006). Em LIE de baixo grau quase não se observam alterações em relação ao epitélio normal; em LIE de alto grau, entretanto, há um retardamento dos estágios tardios de replicação. Ainda, a replicação viral se restringe a uma área cada vez menor do epitélio até a não expressão das proteínas tardias e consequente ausência na produção de vírions no CC (Doorbar, 2006) (Figura 6).

A região LCR do genoma dos PV, não codificante, contém elementos iniciadores que se acredita serem essenciais para a expressão inicial de genes virais após a infecção. Por outro lado, a região LCR parece ser importante também na manutenção da latência viral (Howley e Lowy, 2001).

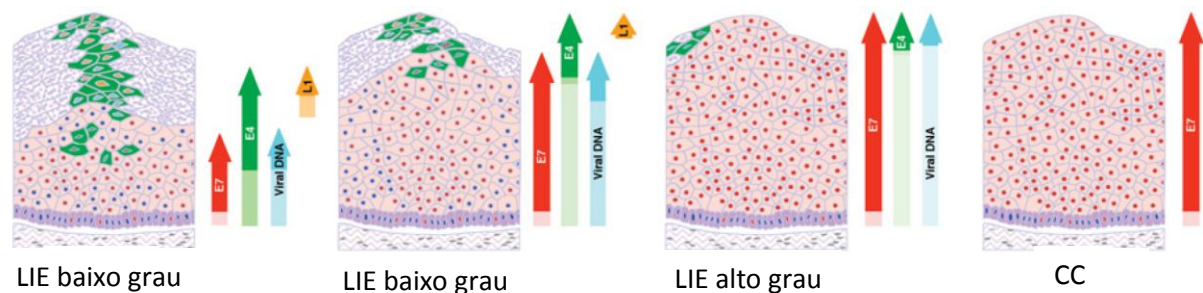


Figura 6. Expressão de proteínas do HPV e replicação viral em epitélio estratificado com lesão. Esquema demonstrando a diferença na expressão e replicação viral nos diferentes graus de lesão intraepitelial escamosa (SIL) e carcinoma cervical (CC). Fonte: Doorbar (2006), adaptado.

A replicação do HPV é restrita ao epitélio escamoso estratificado. Pelo fato de as células basais serem a origem da linhagem epitelial, é necessário que o

HPV a infecte para produzir infecção, conforme anteriormente descrito (Stubenrauch & Laimins, 1999).

Os PV apresentam três modelos para a replicação do DNA viral. O primeiro ocorre durante a infecção inicial dos queratinócitos basais pelo vírus, com amplificação do genoma viral em 50 a 100 cópias (Howley e Lowy, 2001). Na fase seguinte ocorre a manutenção do genoma, que acontece nas células basais em divisão, bem como nos fibroblastos na derme em fibropapilomas. Nestas células o DNA viral é mantido como múltiplas cópias de plasmídeo estável. O genoma viral replica, em média, uma vez por ciclo celular durante a fase S, em sincronia com o genoma da célula hospedeira (Gilbert et al., 1987) e podem ser repartidos fielmente para as células filhas. Esse tipo de replicação de DNA assegura uma infecção latente e persistente na célula basal epitelial escamosa.

O terceiro tipo de replicação de DNA é chamado de replicação vegetativa, que ocorre nas células epiteliais terminalmente diferenciadas. Nestas células, observa-se expressão de genes tardios, síntese de proteínas do capsídeo, síntese de DNA viral vegetativo e liberação de novos vírions (Howley e Lowy, 2001). Os mecanismos que regulam a transição do genoma na forma de plasmídeo para replicação vegetativa do DNA viral são desconhecidos. Essa transição pode envolver a presença ou a ausência de fatores controladores celulares nos queratinócitos diferenciados.

2.1.3.5 Montagem e Liberação

Pouco se sabe sobre a montagem e liberação do HPV. Partículas virais são observadas na camada granular do epitélio e não em níveis baixos. Acredita-se que o vírus não seja citolítico, e a liberação das partículas virais não ocorre antes da camada cornificada do epitélio queratinizado (Chow & Broker, 1997).

Estudos com papilomavírus e poliomavirus sugerem que, uma vez expressas, as proteínas do capsídeo sejam montadas em capsídeos icosaédricos pela assistência de proteínas chaperonas (Buck et al., 2005; Chromy et al., 2003, 2006; Bird et al., 2008). Ainda não é conhecido se a encapsidação do genoma viral se dá durante a montagem do capsídeo ou depois; entretanto, a

encapsidação é assistida pela proteína L2 e pode ser facilitada pela proteína E2 (Heino et al., 2000; Gu et al., 2004; Holmgren et al., 2005). No epitélio cornificado, acredita-se que proteínas E1^{E4} interajam com redes celulares, causando seu colapso, e assim permitindo o escape dos vírions maduros das células cornificadas (Doorbar et al., 1986; Bryan & Brown, 2000; Brown et al., 2006; Mach et al., 2006; Gambhira et al., 2007).

2.1.3.6 Participação das proteínas E6 e E7 na transformação celular

A integração do DNA de HPV no genoma das células hospedeira é considerada um importante passo na progressão maligna (zur Hausen, 1991). Esta integração tem impacto na transformação celular, na manutenção do fenótipo transformado e /ou na progressão do tumor. Com a integração do genoma ocorre quebra no gene E2 com conseqüente interrupção da transcrição do gene *E2*, o que está usualmente associada com lesões malignas já que esta interrupção leva a maior expressão das proteínas E6 e E7, sustentando a imortalidade das células infectadas e ainda, bloqueando o programa de diferenciação das células epiteliais (Syrjänen & Syrjänen, 2000).

A oncoproteína E7 se liga à proteína do retinoblastoma (pRb) e inativa sua função impedindo a ligação da pRB ao fator de transcrição E2F (Dyson et al., 1989). A proteína Rb é inativa em sua forma hipofosforilada e se liga a E2F para prevenir a entrada na fase S. Durante o ciclo celular normal pRb é hipofosforilada pela ciclina D1/ciclina dependente de cinase (CDK)4 e pelo complexo ciclina E/CDK2, causando dissociação da pRb de E2F, permitindo a progressão normal para fase S (Munger & Howley 2002; Jo & Kim 2005). A oncoproteína E7 do HPV se liga a pRb hipofosforilada, prevenindo sua interação com E2F; portanto, em células superexpressando E7 do HPV, o ponto de controle da transição G1/S é perdido e as células atravessam o ciclo celular levando à proliferação celular descontrolada (Dyson 1998; Jo & Kim 2005). E7 parece ainda causar a degradação de pRb através de via mediada por ubiquitina-proteassomo (Boyer et al., 1996).

Além da interação com os membros da família pRb, E7 interage com uma grande variedade de proteínas celulares e uma classe de proteínas é a histona

desacetilase (HDAC). A ligação de E7 à HDAC permite a transcrição de E2F (Brehm et al., 1999; Longworth & Laimins 2004b) que promove proliferação celular. E7 do HPV se liga também à CDK2/ciclina A e CDK2/ciclina E, e ativa essas cinases que fosforilam pRb e induzem a transcrição de genes da fase S (Arroyo et al., 1993; McIntyre et al., 1996). Foi observado que E7 se liga ainda aos inibidores de CDK p27 e p21, que removem o ponto de controle do ciclo celular da interface G1/S (Zerfass-Thome et al., 1996; Funk et al., 1997) e promovem continuação sucessiva do ciclo celular.

A proteína E6 de HPV de alto risco é suficiente para induzir e manter a transformação celular (Hawley-Nelson et al., 1989; Thompson et al., 1997; Duensing & Munger 2002; Munger et al., 2004). Foi demonstrado que a proteína E6 do HPV se liga à p53 e causa sua degradação pelo proteossomo 26S (Scheffner et al., 1990; Werness et al., 1990; Crook et al., 1991; Band et al., 1993; Havre et al., 1995; Scheffner et al., 1993; Li & Coffino 1996). A degradação de p53 ocorre através de um complexo trimérico contendo E6, proteína associada a E6 (E6AP) e p53 (Talis et al., 1998; Zanier et al., 2005). E6AP atua como ubiquitina ligase que ubiquitina p53 e a torna alvo de degradação pelo proteossomo. E6 do HPV também inativa p73, que é homóloga à proteína p53 (Park et al., 2001). Entretanto, estudo recente demonstrou que E6 de HPV de alto risco pode degradar a proteína p53 na ausência de E6AP (Massimi et al., 2008). A inativação de p53 compromete a integridade do DNA replicado, causa danos no DNA (Havre et al., 1995; Kessis et al., 1996) e instabilidade cromossômica (Schaeffer et al., 2004; Thomas & Laimins 1998). Estas anormalidades resultam em proliferação celular ou desenvolvimento de tumor (Foster et al., 1994; Cheng et al., 2007; Cooper et al., 2007; Hebner et al., 2007).

2.1.4 Epidemiologia e Implicações Clínicas

Todos os tipos de HPV têm como alvo as células epiteliais de superfície cutânea ou mucosa. A infecção começa com a entrada do vírion através do epitélio traumatizado e, então, segue um dos três desfechos da infecção viral crônica: (i) infecção latente, na qual não há evidência macro ou microscópica de lesão; (ii) infecção subclínica, em que a colposcopia e a microscopia

revelam evidência de infecção na ausência de doença clínica; (iii) doença clínica (Koutsky, 1997).

Evidências clínicas e histopatológicas de infecção pelo HPV normalmente aparecem dentro de um a oito meses após a exposição inicial ao vírus (Oriel, 1971) que tem a capacidade de causar uma grande variedade de lesões, dependendo do tipo associado ou mesmo, conforme região anatômica envolvida (zur Hausen, 2002; Howley & Lowy, 2007) (Quadro 3).

Lesões benignas incluem verrugas em região não-genital e anogenital, papilomas orais e laríngeos e condilomas mucosos na região anogenital. Infecções anogenitais são principalmente transmitidas sexualmente, onde infecções persistentes podem levar à progressão para tumores (Lowy & Schiller, 2006). Cerca de 80% das mulheres jovens sexualmente ativas se infectam com HPV e muitas vezes o vírus é eliminado espontaneamente (Baseman & Koutsky, 2005).

Quadro 3. Tipos de HPV e apresentação clínica. Fonte: de Villiers (2004), adaptado.

SÍTIO	APRESENTAÇÃO CLÍNICA	TIPOS
Trato genital	condiloma acuminado	6, 11, 42, 43, 51, 53 55, 83
	câncer genital (cervical e outros anogenital)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 69
	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 respiratório	6, 11
Boca	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

Cerca de 40 tipos de HPV estão relacionados à infecção anogenital causando condilomas, que ocorrem com maior frequência em adultos jovens, sexualmente ativos e em populações sexualmente promíscuas (Strickler et al., 1999). Conforme anteriormente descrito (Quadro 1), esses HPV podem ser divididos nas categorias “alto-risco” (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) e “baixo-risco” (6, 11, 42, 43, 44) baseadas no risco de progressão para lesões malignas que induzem na cérvix (Munõz et al., 2000, 2002). Estudos de prevalência apontam o genótipo 16 como o mais prevalente e responsável, juntamente com genótipo 18, por cerca de 70% dos casos de CC (Bosch et al., 1995; Muñoz et al., 2000; Clifford et al., 2003). A frequência dos

tipos de alto-risco pode variar de acordo com fatores geográficos, demográficos e clínico-patológicos (Hwang, 1999; Lai et al., 1999; Lo et al., 2001) e pode também ser influenciada pelos métodos utilizados na detecção (Qu et al., 1997; Meyer et al., 1998; Camara et al., 2003). Estima-se que ocorram no mundo 500.000 novos casos de CC por ano, 80% nos países subdesenvolvidos, e aproximadamente 275.000 mortes anuais (WHO, 2007). No Brasil, o CC é o segundo câncer mais comum em mulheres, com 18.000 a 19.000 novos casos por ano e com incidência regional variando de 18 a 24 por 100.000 mulheres (Ministério da Saúde, 2007).

2.1.5 Resposta Imune ao HPV

O ciclo de replicação exclusivamente intraepitelial do HPV é de importância central para entender a resposta do hospedeiro e apresenta alguns fatores chave no reconhecimento e na resposta do sistema imune do hospedeiro ao HPV. Primeiramente, nenhuma inflamação acompanha a infecção viral e não há sinal de perigo para alertar os sensores do sistema imune inato; segundo, embora o HPV pareça ser capaz de se ligar e entrar em outras células que não os queratinócitos, a expressão dos genes virais e síntese de proteínas são restritas aos queratinócitos, dessa forma, não há síntese de proteínas virais em células apresentadoras de antígenos. Finalmente, viremia não ocorre ou é baixa, havendo pouco acesso aos linfonodos, onde a resposta imune adaptativa é iniciada (Stanley, 2009).

Mesmo com todos esses impedimentos existe uma resposta imune contra o HPV. Verrugas cutâneas e ano-genitais regredem espontaneamente e a análise histológica desse fenômeno mostra a presença de grande infiltrado no estroma e epitélio das verrugas de células T (CD4+ e CD8+) e macrófagos (Coleman et al., 1994). O infiltrado linfocítico expressa marcadores de ativação sendo dominantes as citocinas pró-inflamatórias (IL-12, TNF- α e IFN- γ) e há uma regulação positiva das moléculas de adesão requeridas para o tráfico de linfócitos no endotélio dos capilares da verruga, características de resposta imune Th1 (Stanley et al., 2003). Já as verrugas genitais que não regredem são caracterizadas por células imunes insuficientes, os poucos linfócitos intra-

epiteliais presentes são células TCD8+ e células mononucleares (Coleman et al., 1994).

Estudos clínicos transversais fornecem apenas um retrato do que é um processo dinâmico e considerações éticas não permitem estudos longitudinais em humanos. No entanto, em modelos animais de infecção por PV de mucosa, como pelo papilomavírus oral de caninos (COPV), os eventos imunológicos de todo o ciclo da verruga, da infecção à regressão, podem ser seguidos e tem fornecido evidências de que a resposta de células TCD4+ para proteína E2 seja importante. Além disso, tais células são encontradas em indivíduos saudáveis sem sinais de infecção por HPV (Welters et al., 2003), apenas ocasionalmente encontradas em pacientes com LIE de alto grau e ausente em pacientes com CC (Welters et al., 2006), sugerindo que a geração de células TCD4+ específicas para a proteína E2 seja um indício de controle imune específico.

Células T citotóxicas específicas para HPV podem ser detectadas em pacientes com infecção ou com infecção prévia por HPV (Evans et al., 1996, 1997; Alexander et al., 1996). Tanto as células TCD4+ e TCD8+ estão envolvidas nessas respostas (Nakagawa et al., 1999). Além das células T citotóxicas, existem evidências de que as células *natural killer* (NK) sejam importantes nas infecções por HPV. Células NK com funções alteradas são correlacionadas com maior frequência de casos de papilomatose respiratória recorrente em crianças (Stern et al., 2007). Ainda, pacientes com doença neoplásica por HPV16 apresentam células NK com atividade reduzida contra os queratinócitos infectados (Cho et al., 2001; Lee et al., 2001).

Estudos sorológicos usando VLPs demonstram que as infecções genitais por HPV são ainda seguidas por eventual soroconversão com anticorpos tipo-específicos para a proteína viral L1 (Dillner et al., 1999). A soroconversão ocorre mais frequentemente entre seis e 18 meses após a primeira detecção do HPV (Carter et al., 1995, 1996; Wideroff et al., 1995). Estudo de infecção experimental por COPV na boca de cães demonstrou que a regressão da lesão foi precedida por migração de células TCD4+ e TCD8+, em menor quantidade,

no estroma e epitélio da verruga e que anticorpos IgG anti-COPV L1 foram detectáveis no mesmo período de tempo (Nicholls et al., 1999).

Essas pesquisas deixam claro que a resposta imune contra o HPV existe, e que a presença de células TCD4+, TCD8+, NK e anticorpos tipo-específicos são de grande importância para regressão de lesões. Porém, em casos de infecções persistentes esses vírus são capazes de evadir das respostas imunes inata e adaptativa, além de apresentarem fatores epigenético que levam a sua defesa, esses mecanismos estão sumarizados no Quadro 4.

Quadro 4. Modulação dos aspectos imunes pela infecção por HPV (Einstein et al., 2009), com modificações.

Possíveis Mecanismos Defensivos do HPV	
Resposta Imune Inata	
Células Dendríticas	Tolerização
Células de Langerhans	Não ativação por virions (ou VLPs) Baixo número na zona de transformação cervical
TLR9	Diminuição da expressão
Vias Antivirais	Diminuição das respostas do Interferon e Proteína Quinase R
Resposta Imune Adaptativa	
Células TCD4+	Resposta baixa contra HPV16 Fenótipo desregulado
Células TCD8+	Respostas baixas contra E6 e E7
Células T regulatórias	Aumento do número durante infecção
Células B ou anticorpos	Baixa resposta de anticorpos contra HPV

TAP1	Regulação para baixo por E7
Citocinas	<p>Aumento da expressão de interleucina 10 na zona de transformação cervical</p> <p>Diminuição de CXL10, interleucinas 1β, 6, e 15</p> <p>Modulação da expressão de Interferon γ, TNF, interleucinas 2, 4, e 12 p40 durante progressão de LIE</p> <p>Altera interleucina 12/interferon γ/TNF para níveis de interleucina 4 ou 10</p>
Quimiocinas	Diminui CCL3, CCL5, CCL20 e CXCL832
Fatores Epigenéticos	
Metilação de <i>p16</i>	Aumento da metilação dos genes antivirais
Outros genes supressores de tumor	Supressão da atividade antiviral via metilação do DNA
HPV LCR	<p>Aumento da metilação durante infecção assintomática</p> <p>Diminuição de metilação sítio-específica em progressão da doença</p>

2.1.6 Diagnóstico Laboratorial

A infecção causada pelo HPV pode ser evidenciada indiretamente mediante exame citológico ou histopatológico a partir de alterações morfológicas sugestivas ou diretamente, mediante testes moleculares que, diferentemente dos anteriores, permitem detectar o genoma e identificar o tipo viral envolvido. Também podem ser utilizadas provas sorológicas baseadas na detecção de anticorpos circulantes e na resposta imunitária celular induzida pela infecção

viral, contudo a detecção de anticorpos se interpreta como um marcador de exposição persistente ao HPV (Bosch et al., 2001).

Atualmente, o exame Papanicolaou é a ferramenta mais usada para a triagem do CC (Gutiérrez-Xicoténcatl et al., 2009). A histopatologia mostra frequentemente dilatação epidermal, como acantose e papilomatose. Na parte superior da camada granulosa e camada espinhosa são encontradas células grandes, vacuolizadas com partículas basofílicas nucleares. Formações de hiperqueratinose acompanhada por paraqueratose podem ser encontradas na epiderme. No Brasil, inquérito domiciliar realizado em 15 capitais e no Distrito Federal demonstrou esta cobertura do Papanicolaou variando de 73,4% em João Pessoa a 92,9% em Vitória, e uma estimativa para 2010 de 18.930 novos casos de CC por cem mil mulheres (Ministério da Saúde, 2004; INCA, 2010). Deve ainda ser considerado que este teste apresenta uma porcentagem de falsos negativos que, dependendo do laboratório, pode chegar a 20-30% dos esfregaços analisados (Melo et al., 2005). Isto pode levar ao diagnóstico de alterações atípicas ambíguas que não podem ser confirmadas, a tratamentos excessivos por citologias duvidosas e a manejo inadequado de pacientes com lesões cervicais cuja citologia foi negativa e que, contudo, poderiam apresentar uma infecção latente apenas diagnosticada molecularmente (Corrente et al., 1997). Alterações observadas no Papanicolaou podem ser identificadas e ter sua localização especificada pela colposcopia, quando pode-se aplicar ácido acético 3- 5% durante 2-3 minutos na cérvix e em caso de presença de áreas de lesão essas se tornam esbranquiçadas.

Técnicas moleculares para detecção do DNA do HPV têm sido introduzidas e o método mais comumente utilizado em pesquisa é a PCR. Até o momento vários iniciadores para diferentes genes do HPV foram desenhados, sendo os mais populares aqueles baseados no gene L1, como MY09/11 (Manos et al., 1989; apud Lie et al., 1996), PGMY09/11 (Gravitt et al., 2000) ou GP5+/6+ (de Roda Husman et al., 1995). A amplificação do DNA do HPV por sistemas de iniciadores consensuais, como os descritos anteriormente, pode detectar até 10 a 100 moléculas alvo de HPV em amostra cervical (Gravitt et al., 1998; van den Brule et al., 2002).

Dado à relação causal que existe entre tipos específicos de HPV com CC e lesões precursoras ressalta-se a importância da utilização de métodos que permitam a genotipagem viral, que atualmente são utilizados em pesquisa. Os métodos moleculares de detecção e identificação do DNA viral compreendem a PCR, que pode detectar apenas a presença do HPV ou identificar o tipo infectante com a utilização de iniciadores para tipos específicos. A PCR pode ainda ser combinada com hibridização ou digestão enzimática para tipagem viral, como no caso da RLB e RFLP, esta última utiliza enzimas de restrição distintas cujo padrão de digestão permite identificar o tipo infectante, Bernard et al., (1994) descreveram a identificação de até 44 tipos distintos com as enzimas *BamH I*, *Dde I*, *Hae III*, *Hinf I*, *Pst I*, *RsaI* e *Sau3A I*. Os kits comerciais disponíveis para genotipagem do HPV incluem o *SPF10-INNO LiPA*, *Invader HPV Test* de segunda geração (Inv2 Test-Third Wave Technologies, Inc) e os métodos de amplificação *AMPLICOR HPV Test* (Roche) e *Roche Linear Array HPV Genotyping Test* (Roche). Existe ainda a captura híbrida de segunda geração (HC2-Digene/QIAGEN), que é capaz de realizar a detecção do vírus e distingui-los entre tipos de alto e baixo risco.

Moléculas de ácido nucléico de fita simples que são complementares formam híbridos sob condições apropriadas e os testes de hibridização são baseados nesse fenômeno, ou seja, no uso de sondas moleculares para detectar moléculas alvo complementares específicas. Existem vários formatos de testes de hibridização, a maioria deles utiliza filtros ou lâminas de vidro como suporte sólido. Os sistemas de hibridização reversa fornecem uma ferramenta atrativa para hibridização simultânea do produto de PCR a múltiplas sondas de oligonucleotídeos. Os métodos mais frequentemente usados envolvem uma membrana contendo múltiplas sondas imobilizadas em linhas paralelas, chamadas *line probe* (LiPA), *line blot assay* (LBA), *linear array* (LA) e hibridização reversa em linha (Gravitt et al., 2000; Castle et al., 2008; Sabol et al., 2008). Nesse sistema, o produto de PCR é gerado usando iniciadores biotinilados, desnaturado sob condição alcalina e adicionado a membrana em tampão de hibridização. Após a hibridização e lavagem, os híbridos podem ser detectados pela adição de estreptavidina e substrato, gerando cor ou quimioluminescência na linha da sonda, que pode ser visualmente interpretada.

Esse método permite detecções de múltiplos tipos de HPV em um único passo e requer apenas uma quantidade limitada de produto de PCR (Kleter et al., 1999; Quint et al., 2001). A Tabela 1 compara diferentes métodos de diagnóstico de HPV.

Tabela 1. Comparação entre diversos testes para detecção de HPV. Adaptado de Gutiérrez-Xicoténcatl et al. (2009).

Teste	Detecta	Uso	Sensibilidade	Especificidade
Papanicolaou	Células anormais em lesões cervicais	Possíveis lesões cervicais	50-84%	91,25%
Colposcopia	Neoplasia cervical	Lesões cervicais	95%	63,75%
Virapap/ViraType	DNA do HPV	Detecção de 7 tipos de HPV	79%	79%
PCR-restrição	DNA do HPV	Detecção e genotipagem	99,5%	97,5%
Captura híbrida I	DNA do HPV	Detecção de tipos de alto (9) ou baixo (5) risco de HPV (testes separados)	71,2%	88,9%
Captura híbrida II	DNA do HPV	Detecção de tipos de alto (13) e/ou baixo (5) risco de HPV (testes separados)	1000 cópias do DNA do HPV ou 0,2-1 pg do DNA do HPV >96%	66,7%
INNO-LiPA <i>detection/</i> teste de genotipagem	DNA do HPV	Detecção e genotipagem de 25 tipos (alto e baixo risco) e detecção do gene <i>β-globina</i> (mesmo teste)	98,4% discariose média a severa	79,4%
<i>Reverse-line blot</i>	DNA do HPV	Detecção e genotipagem de 27 tipos (alto e baixo risco) e detecção do gene <i>β-globina</i> (mesmo teste)	10-100 cópias/PCR	Pequena reação cruzada entre tipos

AMPLICOR HPV	DNA do HPV	Detecção de 13 tipos de alto e baixo risco e detecção do gene <i>β-globina</i> (mesmo teste)	100 cópias/PCR de tipos de alto risco 95,2%	Sem reação cruzada com tipos de baixo risco 96,7%
Linear Array HPV	DNA do HPV	Detecção e genotipagem de 37 tipos de HPV anogenitais	Ainda em verificação	
COBAS TaqMan HPV	DNA do HPV	Tipos de alto risco e carga viral	Ainda em verificação	
ELISA-VLP-16	Anticorpos neutralizantes	Exposição ao HPV	53%	97%
ELISA-proteínas precoces	Anticorpos anti E4 e E7	Marcador sorológico de ciclo viral e progressão de lesão	67%	78%

2.1.7 Vacina

A infecção pelo HPV é requisito para desenvolvimento de câncer genital com o CC sendo o mais prevalente deles. Dessa forma, teoricamente, se a infecção por HPV for totalmente erradicada a maioria dos cânceres genitais poderiam ser evitados.

O estudo de vacinas contra o HPV começou há aproximadamente 11 anos. Koutsky et al. (2002) foram os primeiros a mostrar os efeitos clínicos profiláticos de uma vacina contra HPV. A Merck Sharp & Dohme (MSD) nos EUA e a Glaxo Smith Kline (GSK) na Europa desenvolveram em larga escala de vacinas contra o HPV, sendo aprovadas e disponíveis comercialmente há alguns anos (Cutts et al., 2007). Os antígenos das vacinas das duas empresas são VLP, produzidas usando proteínas L1 do HPV super expressas em leveduras ou células de inseto (Quadro 4). Essas partículas apresentam externamente uma estrutura tri-dimensional similares àquelas das partículas virais, mas não apresentam o genoma do vírus e, portanto, não são infecciosas (Cutts et al., 2007).

O principal problema das vacinas L1-VLP é o seu insignificante efeito profilático para outros tipos de HPV (Ochi et al., 2008). Portanto, MSD e GSK desenvolveram vacinas de coquetéis compostas por L1-VLPs correspondentes aos tipos de HPV alvo, respectivamente: quadrivalente contra os tipos 6, 11, 16 e 18 (Gardasil®) e bivalente contra os tipos 16 e 18 (Cervarix®) (Harper et al., 2006; Villa et al., 2006) (Quadro 4). Um acompanhamento após a inoculação com a vacina quadrivalente demonstrou a prevenção de infecção persistente com todos os quatro tipos de HPV em 96 por cento (Villa et al., 2006). Embora os níveis de anticorpos tenham se mantido por quatro a cinco anos (Villa et al., 2006, 2006; Harper et al., 2006), ainda não se sabe se esses títulos podem se manter por longos períodos ou se será necessária uma dose adicional da vacina (Mariani e Venuti , 2010).

As vacinas liberadas para comercialização são usadas em mulheres não infectadas para prevenir infecção/propagação. Para vacinação em massa de mulheres não infectadas, esta deve ser realizada em mulheres com cerca de dez anos de idade, antes do início da atividade sexual (Kawana et al., 2009).

No Brasil, o Ministério da Saúde já aprovou o uso tanto da vacina quadrivalente quanto da bivalente. Apesar das vacinas para o HPV já terem sido liberadas para uso no Brasil, o governo ainda não a oferece gratuitamente. Ambas as vacinas estão disponíveis na rede privada, a um custo elevado. A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) em 28/08/2006 aprovou a vacina quadrivalente da MSD e a vacina bivalente da GSK em fevereiro de 2008 para uso em meninas e mulheres com 9 a 26 anos de idade.

Quadro 5. Vacinas para HPV, quadri e bivalentes liberadas para comercialização, e descrição dos tipos alvo, adjuvantes utilizados, sistema de produção e indicação das vacinas.

Vacinas		
	Quadrivalente (Sanofi Pasteur MSD / Merk)	Bivalente (GSK)
HPV VLPs	Tipos de HPV 6, 11, 16 e 18	Tipos de HPV 16 e 18
Adjuvante	Sulfato hidroxifosfato de alumínio amorfo AAHS	Al(OH) ₃ , Monofosforil lipídeo A
Sistema de Produção	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CANADE 3C-5	Células Hi-5 Rix4446 (<i>Trichoplusia ni</i>)
Indicação	9 a 26 anos, incluindo meninos de 9 a 15 anos	10 a 25 anos

2.2 Relação HPV-HIV

HPV e HIV são vírus causadores de doenças sexualmente transmissíveis (DSTs), frequentes mundialmente (Pinto et al., 2005). É relatada uma maior prevalência de infecção por HPV entre as mulheres soropositivas para HIV (Sun et al., 1995; Levi et al., 2002), assim como maior tempo de persistência da infecção (Moscicki et al., 2004) fazendo com que estas mulheres constituam um grupo de risco para desenvolvimento de CC (Palefsky et al., 1999; Frisch et al., 2000; Ahdieh et al., 2001; Cardillo et al., 2001). Provavelmente este fato se deve aos riscos epidemiológicos compartilhados pelas duas infecções como início precoce da vida sexual, múltiplos parceiros e presença de outras DSTs

(Queiroz et al., 2004), ao comprometimento da resposta imune celular, que permite uma alta carga viral e persistência da infecção pelo HPV, além de apresentarem como grupo de risco mulheres jovens e minorias étnicas (Levi et al., 2002; Queiroz et al., 2004).

Diversos estudos descrevem esta associação entre HPV-HIV e revelam que as mulheres coinfetadas em relação às não coinfetadas com HIV apresentam: i) maior risco para LIE (Mandelblatt et al., 1999); ii) níveis mais altos de DNA de HPV em lavados cervicovaginais (2-3 vezes) e em *swab* anal (15 vezes) (Hillemanns et al., 1996; Chiasson et al., 1997; Sun et al., 1997); iii) aumento da persistência do HPV por mecanismo ainda não conhecido (Minkoff et al., 2004); iv) maior risco no desenvolvimento e progressão das lesões intraepiteliais (5 vezes) (Laga et al., 1992; La Ruche et al., 1998; Ellerbrock et al., 2000); v) menor chance de regressão das lesões intraepiteliais de baixo-grau e alta incidência de lesões de alto-grau (Sun et al., 1997). Em 1993, o CDC (*Center of Diseases Control and Prevention*) declarou que mulheres HIV soropositivas entram na fase de doença, AIDS, se estiverem com CC invasivo.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a frequência dos genótipos de HPV em mulheres soropositivas e soronegativas para HIV, atendidas no Centro de Referência em DST/AIDS (CR-DST/AIDS), do município de Vitória-ES.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar os tipos de HPV e suas frequências em mulheres soropositivas para HIV atendidas no CR-DST/AIDS, do município de Vitória;
- b) Determinar dos tipos de HPV e suas frequências em mulheres soronegativas para HIV atendidas no CR-DST/AIDS, do município de Vitória;
- c) Categorizar os tipos de HPV como de alto e baixo risco nas mulheres soropositivas e soronegativas para HIV, atendidas no CR-DST/AIDS, do município de Vitória;
- d) Determinar a frequência de infecções múltiplas pelo HPV nas mulheres soropositivas e soronegativas para HIV, atendidas no CR-DST/AIDS, do município de Vitória;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo descritivo, realizado em espécimes cervicais obtidos de mulheres atendidas no Centro de Referência em DST/AIDS (CR-DST/AIDS), Vitória-ES, no período de março a dezembro de 2006.

4.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram incluídas neste estudo mulheres com idade entre 14 e 51 anos, atendidas em clínica de DST (CR-DST/AIDS, Vitória-ES), após serem convidadas a participar da pesquisa durante consulta ginecológica de rotina. As coletas do espécime para pesquisa foram obtidas após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.3 ESPÉCIME

As amostras clínicas, constituídas por secreção endocervical, foram coletadas em atendimento de rotina no CR-DST/AIDS, pela médica responsável Dra. Bettina Lima durante o desenvolvimento de sua dissertação de mestrado (Lima et al., 2009).

Para a pesquisa de genótipo viral, foram usadas amostras de secreção endocervical positivas para HPV (n=87), provenientes de mulheres soropositivas (n=39) e soronegativas (n=48) para HIV, obtidas com auxílio de escova ginecológica (*cytobrush*) e suspensas em 1 mL de tampão TE (Tris 0,1M, EDTA 0,2M) pH 7,2, que estavam armazenadas em freezer -70°C.

Sorologia para HIV foi realizada de todas as mulheres deste estudo no Laboratório Central do Estado (LACEN).

4.4 ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa obteve aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde-UFES, em 28 de setembro de 2005 (Anexo 1).

4.5 EXTRAÇÃO DO DNA

DNA viral foi extraído das amostras por dois métodos: i) precipitação em membrana de sílica-gel através do uso do *kit* QIAamp[®] DNA Mini Kit[™] (QIAGEN, Hilden, Germany) para sangue e fluidos biológicos, conforme as instruções do fabricante e, ii) lise celular e dissociação de nucleoproteína viral através de isotiocianato de guanidina e adsorção em partículas de sílica (Boom et al., 1990), descritas a seguir.

4.5.1 Extração do DNA por QIAamp[®] DNA Mini Kit[™]

A 20 µL de proteinase K foram adicionados 200 µL de espécime cervical homogeneizada e 200 µL de tampão de lise (AL). Este tampão contém sais de guanidina, responsável pela lise celular e dissociação da nucleoproteína viral. A mistura foi homogeneizada durante 10 s, incubada em banho-maria (BM) à 56°C por 10 min e centrifugada rapidamente. Foram adicionados 200 µL de etanol PA aos tubos contendo amostra, e então foram homogeneizados e centrifugados rapidamente. Esta solução foi aplicada à coluna contendo matriz de sílica e centrifugada a 6000 x g, durante 1 min. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor descartando-se o filtrado e a ela foram adicionados 500 µL de tampão de lavagem (AW1), centrifugada a 6000 x g por 1 min e transferida para um novo tubo coletor, descartando-se novamente o filtrado. À coluna foram adicionados 500 µL de tampão de lavagem (AW2) e centrifugada a 20000 x g durante 3 min. A coluna foi transferida para novo microtubo, descartando-se o filtrado. Foram adicionados à coluna 60 µL de tampão de eluição (AE), para eluição do DNA, seguido por incubação à temperatura ambiente (TA) por 5 min e centrifugação a 6000 x g durante 1 min. Esta solução final contém o DNA do material clínico e foi mantida em refrigeração até a realização da detecção do gene *β-globina* e do genoma viral. O método de extração descrito está parcialmente esquematizado na Figura 7.

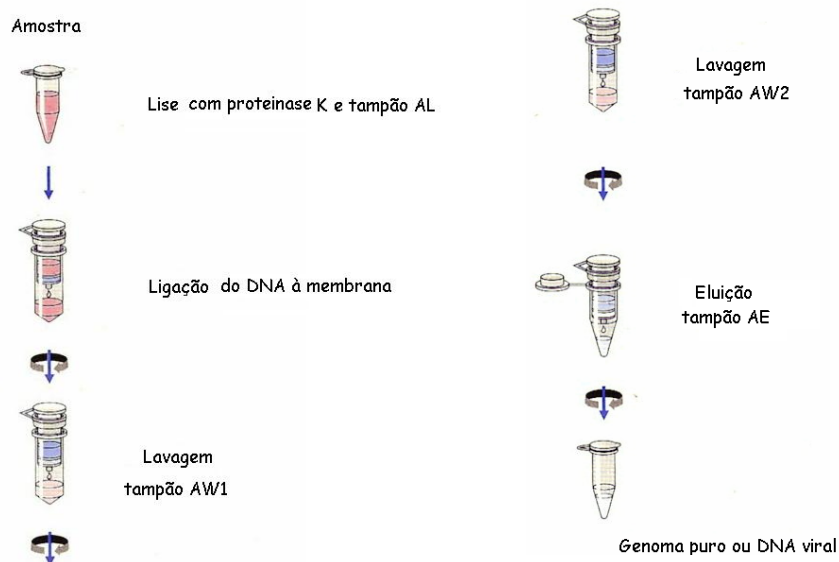


Figura 7. Esquema de extração do DNA através do *kit* de extração QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN), adaptado do protocolo fornecido pelo fabricante.

4.5.2 Extração do DNA através de isotiocianato de guanidina e adsorção em partículas de sílica

Seguindo o protocolo de extração de ácido nucléico descrito por Boom et al. (1990), 200 µL de espécime cervical foram homogeneizados por 10 segundos com 800 µL de tampão L6 (Item 4.10 Reagentes e Soluções), incubados à temperatura ambiente (TA) por cinco minutos e 10 µL de sílica foram adicionados. Após a homogeneização por 10 segundos os tubos ficaram por 20 minutos no agitador orbital. Os microtubos foram centrifugados por 3 minutos a 16.000 xg e ao sedimento foram então adicionados 500 µL de tampão L2 (Item 4.10 Reagentes e Soluções). Após a homogeneização por 10 segundos os microtubos foram centrifugados por 3 minutos a 16.000 xg e ao sedimento foram adicionados 500 µL de etanol 70% gelado, homogeneizados por 10 segundos e centrifugados por 3 minutos a 16.000 xg. O sobrenadante foi novamente descartado e então foram adicionados 500 µL de acetona PA gelada, os microtubos foram homogeneizado por 10 segundos e centrifugados por 3 minutos a 16.000 xg. O sobrenadante foi descartado e os tubos incubados em banho-maria por 15 minutos a 56°C. Foram então adicionados 50 µL de água livre de RNase e DNase (tratada com dietilpirocarbonato – DEPC), homogeneizados manualmente e incubados em banho-maria por 15

minutos a 56°C. Após a incubação os microtubos foram agitados em vórtex e centrifugados por 6 minutos a 16.000 xg. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e armazenado em refrigeração até a realização da detecção do gene *β-globina* e do genoma viral.

4.6 DETECÇÃO DO GENE *β-GLOBINA*

Amplificação do gene *β-globina* foi utilizada como controle da extração e da integridade do DNA obtido. Dois microlitros do DNA extraído foram adicionados a 23 µL da mistura de reação para PCR, conforme determinado anteriormente (Freitas et al., 2009), e submetido à reação de amplificação do gene *β-globina*, utilizando os iniciadores 9/22 e 13/22 (Huang et al., 1989) (Quadro 5). As concentrações da mistura de reação bem como o programa utilizado para amplificação do material genético estão apresentados nos Quadros 7 e 8.

Os produtos da amplificação foram observados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio (EtBr) 0,5 µg/mL e observados sob luz UV em transiluminador acoplado ao sistema *Mini Bis Pro* (Bio - imaging. Systems).

Como controles negativos das reações de amplificação, foram utilizados extração de água, paralelamente à extração da amostra clínica, e mistura de reação com água estéril livre de RNase e DNase, adicionada em lugar da amostra. Todos os cuidados necessários foram tomados durante as etapas de extração como preparo da mistura de reação e aplicação das amostras realizados em salas distintas. Todas as reações de amplificação foram realizadas no termociclador *Perkin Elmer CETUS*.

Quadro 6. Iniciadores para reação de PCR do gene *β-globina* (Huang et al., 1989).

Iniciador	Determinação: <i>sense</i> ou <i>anti-sense</i>	Sequência de bases
9/22	<i>Sense</i>	5'- ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC - 3'
13/22	<i>Anti-sense</i>	5'- CAT CAG GAG TGG ACA GAT CC - 3'

4.7 AMPLIFICAÇÃO DO DNA DO HPV

Detecção de DNA do HPV foi realizada utilizando-se os iniciadores consensuais degenerados MY09/MY11 e PGMY09/11 (Quadros 6 e 7 respectivamente), que amplificam um fragmento da região *L1* dos HPV de baixo e de alto risco, descritos por Manos et al. (1989, apud Lie et al., 1996) e Gravitt et al. (2000), respectivamente, sendo que os iniciadores PGMY11 são biotinilados. Os produtos das reações de amplificação foram utilizados nas reações de RFLP e RLB, respectivamente, conforme descritos no subitem 4.9 (genotipagem). Porém, a amplificação com os iniciadores PGMY09/11 somente foi realizada nas amostras cujos produtos de amplificação foram insuficientes para tipagem por RFLP (item 4.9). O programa de amplificação com os iniciadores MY09/11 foi realizado conforme descrito por Oliveira et al. (2003) com algumas modificações e o volume final da reação foi de 100 µL. O programa de amplificação com os iniciadores PGMY09/11 foi realizado conforme descrito pela Gravitt et al. (2000) e o volume final da reação foi de 50 µL. As misturas para PCR e os programas de amplificação estão descritos nos Quadros 8 e 9, respectivamente.

Quadro 7. Iniciadores consensuais MY09/11 utilizados na detecção de HPV de amostras e posterior tipagem por *Restriction Fragment Length Polymorphism*.

Iniciador	Determinação: <i>sense</i> ou <i>anti-sense</i>	Sequência de bases
MY09	<i>Anti-sense</i>	5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3' *
MY11	<i>Sense</i>	5'-MCAGGGWCATAAYAATGG-3' *

* M = A / C; R = A / G; W = A / T; Y = C / T.

Quadro 8. Iniciadores consensuais PGMY09/11 utilizados na detecção por PCR e posterior tipagem de HPV por hibridização reversa em linha.

Iniciador	Seqüência (5' – 3')
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
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	G CCA AGG GGA AAC TGA TC
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	G CCC AAC GGA AAC TGA TC
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

As amostras consideradas positivas para PCR de HPV foram aquelas que apresentaram fragmentos de 450 pb. Controles negativos foram utilizados em todas as reações de PCR, conforme item 4.5, assim como o procedimento descrito para observação dos produtos de amplificação em gel de agarose.

Quadro 9. Mistura para PCR para o gene *βglobina* e PCR para HPV com iniciadores MY09/11 e PGMY09/11.

Reagentes da mistura para PCR	Concentração / volume (50 µL reação)		
	<i>β-globina</i>	HPV (MY)	HPV (PGMY)
d XTP	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
Tampão de reação (10X)	5 µL	5 µL	0,5 µL
MgCl ₂ 50mM:	1,5 mM	1,5 mM	3 mM
Iniciadores:	0,32 µM	40 pmol	80 nM
	0,32 µM	40 pmol	80 nM
Taq polimerase	0,05 uds	0,1 uds	1,25 uds
DNA (amostra)	4 µL	10 µL	5 µL

Quadro 10. Programas de amplificação para o gene *β -globina* e HPV.

Fase do programa		Descrição do programa					
		<i>β-globina</i>		HPV (MY)		HPV (PGMY)	
		Tempo	°C	Tempo	°C	Tempo	°C
Desnaturação inicial		2 min	94	5 min	94	9 min	95
35 ciclos	Desnaturação	20 s	94	1 min	94	1 min	95
	Anelamento	30 s	50	2 min	55	1 min	55
	Extensão	30 s	72	2 min	72	1 min	72
Extensão final		10 min	72	10 min	72	7 min	72

4.8 QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A quantificação do DNA do HPV amplificado por PCR foi realizada através do espectrofotômetro NanoDrop™ (NanoDrop Technologies).

4.9 GENOTIPAGEM DO HPV

A determinação do genótipo do HPV foi realizada por RFLP e RLB. Somente amostras cujos produtos de amplificação obtidos na PCR foram insuficientes para serem observados na eletroforese em gel após digestão com enzimas de restrição é que foram tipadas por RLB.

4.9.1 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Genotipagem de HPV foi realizada por *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)* com a digestão do produto de PCR obtido com os iniciadores degenerados MY (item 4.7), com as enzimas específicas *BamH I*,

Dde I, *Hae III*, *Hinf I*, *Pst I*, *Rsa I* e *Sau3A I* (Promega, Madison, WI, USA), que permitem a detecção de 44 tipos de HPV (Bernard et al., 1994). A 20 μ L contendo 1 μ g/ μ L de DNA amplificado foram adicionados 70 μ L de água livre de DNase e RNase e 12 μ L de tampão de digestão (NaCl 1 M, MgCl₂ 100 mM, Tris-HCl pH 7,5 100 mM, β -mercaptoetanol 100 mM), distribuídos em oito microtubos. Em sete desses foram adicionadas 10 uds das respectivas enzimas de restrição e em um, sem a adição de enzima, foi utilizado como controle da presença do produto de 450 pb da reação de PCR. A reação ocorreu em banho-maria a 37°C, *overnight*, e os fragmentos de digestão obtidos foram revelados em gel de agarose 3% e observado conforme descrito anteriormente ou em gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata segundo Boulikas e Hancock (1981) e descrito a seguir. O gel de poliacrilamida foi tratado com solução fixadora por 30 minutos em agitador orbital e, após remoção, incubado com solução de nitrato de prata por 30 minutos, seguido por duas lavagens com água destilada. O gel foi então incubado com a solução reveladora e a revelação, interrompida com solução de ácido acético e, por sua vez interrompido pela solução de etanol. O gel foi observado em negatoscópio.

4.9.2 Hibridização Reversa em Linha (RLB)

A RLB foi realizada conforme descrito por van den Brule et al. (2002), com modificações, no Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) - ANLIS Dr Carlos G Malbrán – Buenos Aires, Argentina). Esse sistema é baseado no uso de *miniblotter*, onde foram localizadas em paralelo 32 sondas diferentes com um grupo 5'-amino, em uma membrana de *nylon* revestida de carboxil. Subsequentemente, até 42 produtos de PCR podem ser pipetados nos canais paralelos do *miniblotter* ficando perpendiculares às linhas das oligosondas depositadas previamente. A hibridização é seguida por incubação da membrana com conjugado estraptavidina-peroxidase e geração da quimioluminescência que é detectada em placa radiográfica (descritas a seguir). As sequências das sondas estão descritas no Quadro 10.

Quadro 11. Sondas tipo-específicas usadas para tipagem dos produtos de PCR utilizando iniciadores PGMY09/11 por Hibridização Reversa em Linha (OMS, 2009).

Tipos de HPV	Sequências [5'-3']*
HPV06_RHP	TGGAAGATGTAGTTACGGATG
HPV11_RHP	GCAGATTTAGACACAGATGCA
HPV16_RHP	GATATGGCAGCACATAATGAC
HPV18_RHP	CCAGGTACAGGAGACTGTGTA
HPV26_RHP	TACGCTGACAGGTAGTAGCAG
HPV31_RHP	AGTATCACTGTTTCGAATTGC
HPV33_RHP	TGTCACTAGTTACTTGTGTGC
HPV34_RHP	GCAGTTGTACTTGTGGATTGT
HPV35_RHP	AGAAGACACAGCAGAACACAC
HPV39_RHP	GTAGAAGGTATGGAAGACTCT
HPV40_RHP	ATAGCCTTGTTGGTAAGGAAC
HPV42_RHP	TGTATCACCAGATGTTGCAGT
HPV43_RHP	ACAGTAGGGTCAGTAGAGGCA
HPV44_RHP	TAGTATATGTAGACGGAGGGG
HPV45_RHP	GTACTIONGGCACAGGATTTTGT
HPV51_RHP	TTACTTGGAGTAAATGTTGGG
HPV52_RHP	CTTTCCTTTAGGTGGTGTGTT
HPV53_RHP	AGACATAGACTGTGTGGTTGC
HPV54_RHP	TTATTAAGCTATCCTGCGTG
HPV55_RHP	GATGGAGACTGAGTTGTAGCA
HPV56_RHP	TTTCGTGCATCATATTTACTT
HPV57a_RHP	TACAGTGGCACACAAAGAGAC
HPV57b_RHP	TTCTGTGTTTACAGTGGCACA
HPV58_RHP	CTTCCTTAGTTACTTCAGTGC
HPV59a_RHP	AGTAGAGCACACACAGAAAGA
HPV59b_RHP	AGTAGAAGCACACACAGAAAG
HPV66_RHP	AGTTAATGTGCTTTTAGCTGC
HPV68_RHP	CTGATTGCAGATAGCGGTATG
HPV69_RHP	GTTTAAAAGTGGCAGATGCAG

HPV70_RHP	CTATATACAGCAGGTATGGCC
HPV 82_RHP	TGCAACAGATTGAGTAACAGC
HPV 83_RHP	AGAGGCTGTGTATTCATTAGC
HPV 84_RHP	ATTCTGATTCGGTGTGGTAG
HPV 73_RHP	GGCATACGTTGTAGTAGAGCT
HLADQ_RHP	CTCRTCTCCATCAAATTCATG

*R= A / G

4.9.2.1 Preparo das amostras

Produtos da PCR (10 µL) obtidos com iniciadores PGMY09/11 biotinizados foram diluídos em 150 µL de tampão SSPE 2x com SDS 0,1% e desnaturados a 96°C por 10 minutos com resfriamento em gelo por 10 minutos imediatamente depois. A mistura foi centrifugada ligeiramente.

4.9.2.2 Preparo da membrana com amostras e hibridização

Membrana de nylon contendo sondas para 32 tipos de HPV foi lavada com 150 mL de 2x SSPE – 0,1% SDS por 5 minutos à temperatura ambiente e colocada no *miniblotter*. Foram aplicados 140 µL do produto diluído e desnaturado em canaletas perpendiculares às das sondas e a membrana incubada em forno de hibridização por 1 hora a 51°C. A membrana foi então lavada em BM a 51°C, com 150 mL de 2x SSPE - 0,5% SDS 2 vezes (10 min, cada), com agitação. A membrana foi incubada com 5 µL do conjugado (estreptavidina-peroxidase 1:4000, GE®) e 20 mL de tampão 2x SSPE – 0,5% SDS em garrafa de rotação por 45 minutos a 42°C. A membrana foi então lavada em BM a 42°C com 150 mL 2x SSPE - 0,5% SDS 2 vezes (10 min, cada), com agitação e no mesmo volume do tampão 2x SSPE por mais 2 vezes (5 min, cada) à temperatura ambiente e escurrida em papel de filtro.

4.9.2.4 Detecção da Hibridização

A membrana foi banhada em 5 mL do reativo de detecção 1 (ECL 1, Amersham) e 5 mL do reativo de detecção 2 (ECL 2, Amersham) por 1 minuto em agitação, cuidadosamente retirada e escurrida em papel de filtro. A

membrana foi colocada entre duas folhas de acetato transparente dentro de um cassete radiográfico. No escuro (luz vermelha) foi disposta uma película fotográfica sobre o acetato, o cassete fotográfico fechado e deixado em exposição durante 15 minutos ou *overnight*. A placa foi revelada com revelador fotográfico comercial diluído 1/5 por 2 minutos sob agitação manual, seguida por lavagem com água, fixador fotográfico comercial diluído 1/5 por 2 minutos sob agitação manual e finalmente a placa foi seca e montada em papel.

4.10 REAGENTES E SOLUÇÕES UTILIZADOS

4.10.1 TBE 10X (pH 8,4)

Tris-HCl (<i>Invitrogen</i>)	1 M
Ácido bórico (<i>Chemco</i>)	1 M
EDTA (<i>Reagen</i>)	0,02 M

4.10.2 Gel agarose 1,5%

Agarose (<i>BioAgency</i>)	1,5 g
TBE 1X q.s.p.....	100 mL.

4.10.3 Tampão 4x “Lower Tris” pH 8.8

Tris hidroximetil-aminometano PA (<i>Invitrogen</i>).....	36,34 g
Água destilada q.s.p.....	200 mL

4.10.4 Acrilamida 50%/ Bisacrilamida 1,3%

Acrilamida (<i>Sigma</i>).....	50 g
N,N'-metileno-bis-acrilamida (<i>Sigma</i>).....	1,3 g
Água destilada q.s.p.....	100 mL

4.10.5 Persulfato de Amônio 2%

Persulfato de amônio (Proquimios).....	0,2 g
Água destilada q.s.p.....	10 mL

4.10.6 Solução fixadora

Etanol PA (<i>Dinâmica</i>).....	20 mL
Ácido acético PA (<i>Impex</i>).....	1 mL
Água destilada q.s.p.....	200 mL

4.10.7 Solução corante Nitrato de Prata

Nitrato de prata PA (<i>Quimex</i>).....	0,185 g
Água destilada q.s.p.....	100 mL

4.10.8 Solução Reveladora

NaOH PA (<i>Reagen</i>).....	6 g
Formaldeído PA (<i>Proquimios</i>).....	1,5 mL
Borohidreto de Sódio PA (<i>Nuclear</i>).....	40 mg
Água destilada q.s.p.....	200 mL

4.10.9 Solução de Interrupção

Ácido acético PA (<i>Impex</i>).....	10 mL
Água destilada q.s.p.....	200 mL

4.10.10 Tampão L2

Isotiocianato de Guanidina (Invitrogen).....	60 g
Solução de Tris-HCl (0,1M pH 6,4) (Invitrogen).....	50 mL

4.10.11 Tampão L6

Isotiocianato de Guanidina (Invitrogen).....	60 g
Solução de Tris-HCl (0,1M pH 6,4) (Invitrogen).....	50 mL
Solução de EDTA 0,2M (Nuclear).....	11 mL
Triton X 100 (Amresco).....	1,3 mL

4.10.12 Tampão SSPE 2x (pH 7,4)

NaCl 3 M (Amresco).....	175,3 g
NaH ₂ PO ₄ 0,2 M (Quimex).....	27,6 g
EDTA 0,02 M (Nuclear).....	7,4 g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

4.10.13 Água DEPC

Dietilpirocarbonato 0,1% (Sigma).....	1 mL
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram inseridos no programa estatístico SPSS – *data entry* (*Statistical Pacckage for the Social Sciences*), versão 17.0, gerando um banco de dados. Este programa foi utilizado para a execução dos cálculos de frequência.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos nesta pesquisa foram aceitos para publicação na revista científica Brazilian Journal of Microbiology (Anexo 2).

5.1 PCR

5.1.1 Detecção do gene β -GLOBINA

Todas as 87 amostras foram positivas para o gene β -globina, utilizado como controle de extração e de integridade de DNA (Figura 8).

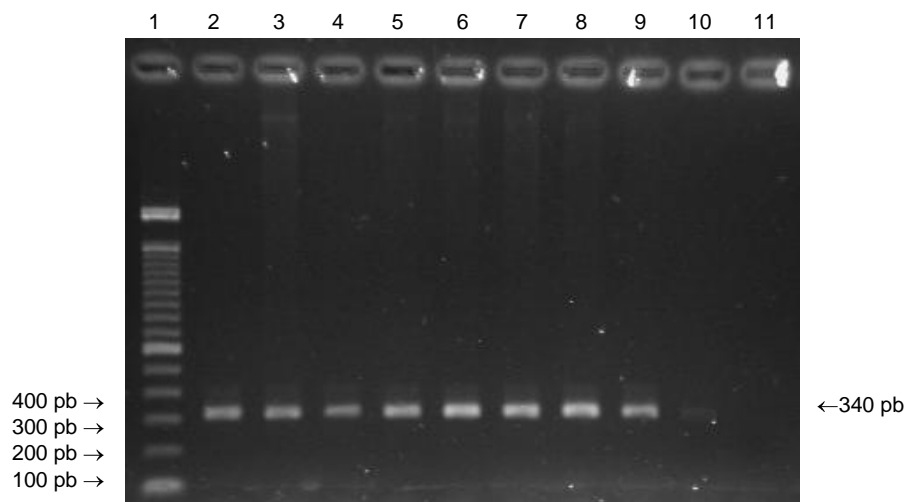


Figura 8. Produto de amplificação do gene β -globina. Eletroforese em gel e agarose a 1,5%, corado com EtBr, do produto de amplificação de 340 pb do gene β -globina, utilizando iniciadores 9/22 e 13/22. Col 1: padrão de peso molecular (100 pb); Col 2-10: amostras positivas; Col 11: controle negativo (extração de água).

5.1.2 Amplificação do DNA do HPV por PCR

O DNA do HPV foi amplificado em todas as 87 amostras (Figura 9).

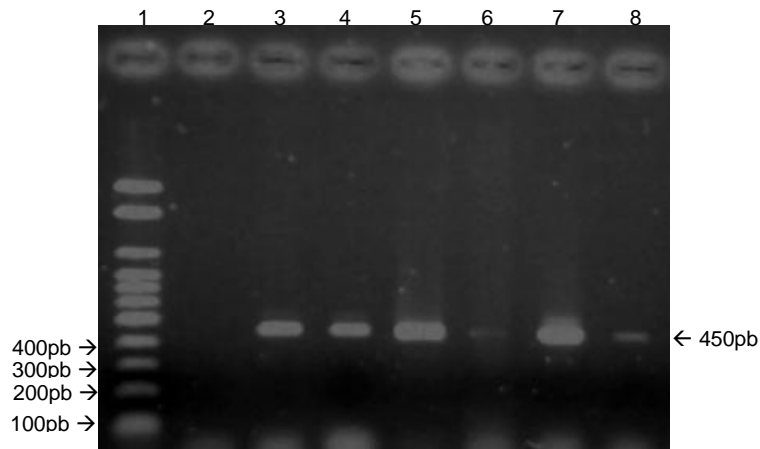


Figura 9. Produto de amplificação do DNA do HPV. Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com EtBr do produto de amplificação de 450 pb do DNA do HPV através de PCR, utilizando os iniciadores MY09 e MY11. Col 1: padrão de peso molecular (100 pb); Col 2: controle negativo; Cols 3-8: amostras positivas para HPV.

5.2 GENOTIPAGEM DO HPV

Para determinar os tipos de HPV infecciosos foram utilizadas as metodologias de RFLP e RLB. As duas técnicas em conjunto foram capazes de genotipar 97,7% (85/87) das amostras utilizadas no estudo. Foram detectados 31 tipos distintos de HPV: 6, 11, 13, 16, 18, 26, 31, 31b, 32, 33, 34, 35, 42, 44, 51, 52, 53, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 68, 71, 81, 82, 83 e 84. Os produtos obtidos com uso de enzima de restrição (RFLP) de alguns tipos determinados estão representados na Figura 10 e os resultados da RLB podem ser observados na Figura 11.

O tipo de HPV mais prevalente foi o HPV16 (14%), seguido pelos tipos 6 e 53 (8,4% cada um) e 11 (7,7%) (Tabela 2).

Tabela 2. Tipos de HPV identificados por *Restriction Fragment Length Polymorphism* e Hibridização Reversa em Linha em mulheres soropositivas e soronegativas para HIV.

	Tipos de HPV	N (%)
Baixo Risco	HPV 6	10 (8,4%)
	HPV 11	9 (7,7%)
	HPV 13	4 (3,3%)
	HPV 32	1 (0,8%)
	HPV 34	1 (0,8%)
	HPV 42	1 (0,8%)
	HPV 44	2 (1,7%)
	HPV 55	2 (1,7%)
	HPV 61	3 (2,5%)
	HPV 62	4 (3,3%)
	HPV 64	1 (0,8%)
	HPV 71	2 (1,7%)
	HPV 81	4 (3,3%)
	HPV 83	4 (3,3%)
	HPV 84	2 (1,7%)
Alto Risco	HPV 16	16 (13,5%)
	HPV 18	3 (2,5%)
	HPV 26	1 (0,8%)
	HPV 31	5 (4,2%)
	HPV 31b	4 (3,3%)
	HPV 33	4 (3,3%)
	HPV 35	1 (0,8%)
	HPV 51	3 (2,5%)
	HPV 52	3 (2,5%)
	HPV 53	10 (8,4%)
	HPV 56	2 (1,7%)
	HPV 58	5 (4,2%)
	HPV 59	2 (1,7%)
	HPV 66	4 (3,3%)
	HPV 68	3 (2,5%)
HPV 82	1 (0,8%)	
	Não Tipado	2 (1,7%)
	Total	119

Do total de tipos determinados 57,3% (67/117) eram de alto e 42,7% (50/117) de baixo risco (Gráfico 1). HPV de alto risco estava presente em 65,8% (56/85) das amostras genotipadas e de baixo risco em 49,4% (42/85) delas.

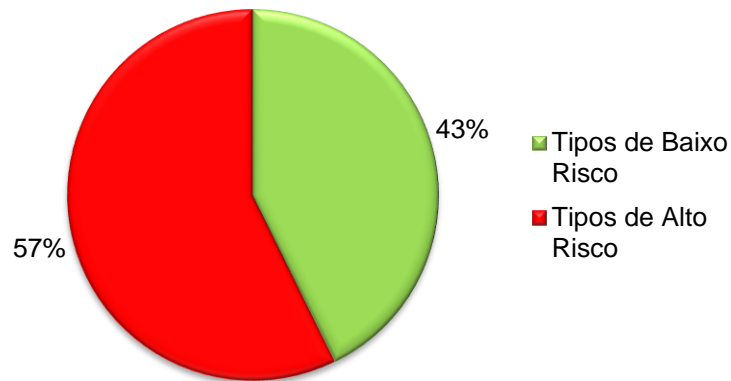


Gráfico 1. Frequência dos tipos de alto e baixo risco de HPV detectados em mulheres soropositivas e soronegativas para HIV.

Entre as mulheres soropositivas para HIV 64% (25/39) apresentavam tipos de HPV de alto risco e 56,4% (22/39) apresentavam tipos de baixo risco (Gráfico 2). Entre as mulheres soronegativas para HIV 62,5% (30/48) apresentavam tipos de HPV de alto risco e 39,5% (19/48) apresentavam tipos de baixo risco (Gráfico 2), e duas amostras não tiveram o tipo identificado.

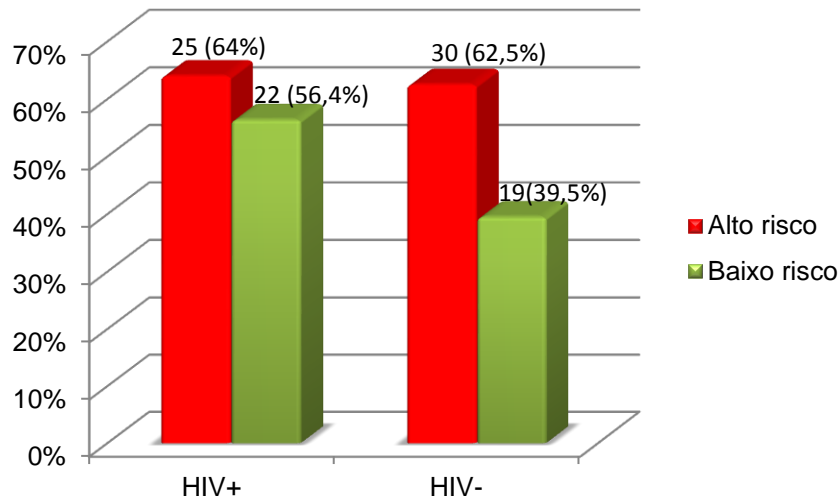


Gráfico 2. Frequência dos tipos de alto e baixo risco de HPV em mulheres soropositivas e mulheres soronegativas para HIV separadamente.

Dentre as amostras de mulheres soropositivas para HIV (n=39) foram encontrados 25 tipos distintos de HPV sendo o mais prevalente deles o HPV16 (11%), seguido pelos tipos 11 (10%), 31 e 53 (8% cada tipo). A frequência de cada um dos vinte e cinco tipos está descrita no Gráfico 3 e na Tabela 3.

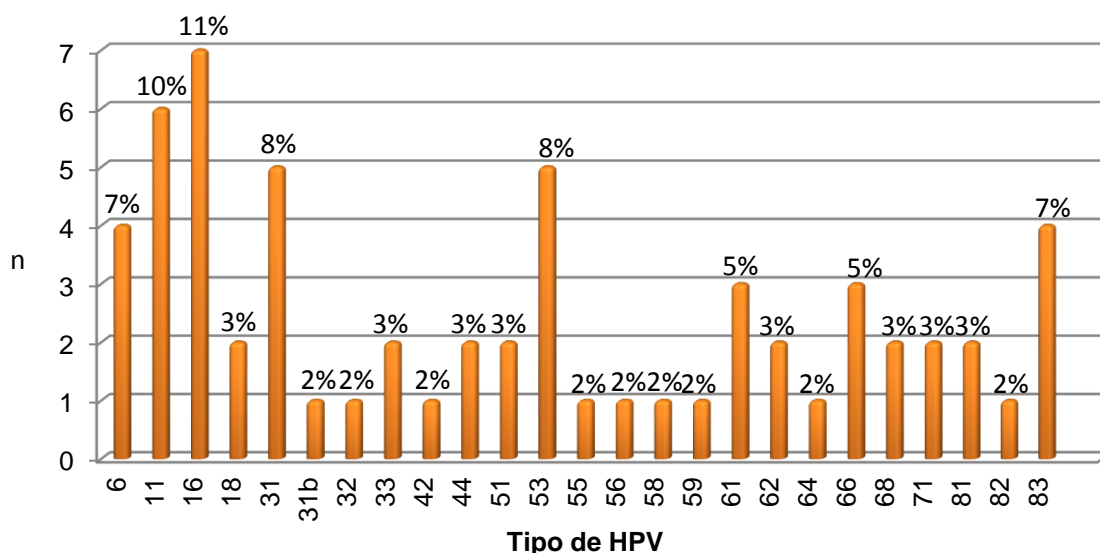


Gráfico 3. Frequência dos tipos de HPV identificados em mulheres soropositivas para HIV.

Dentre as amostras de mulheres soronegativas para HIV (n=48) foram encontrados 22 tipos distintos de HPV sendo o mais prevalente deles o HPV16 (16%), seguido pelo tipo 6 (11%) e 53 (9%). Dois tipos não foram determinados. A frequência de cada um dos vinte e dois tipos e dos tipos não determinados está descrita no Gráfico 4 e na Tabela 3.

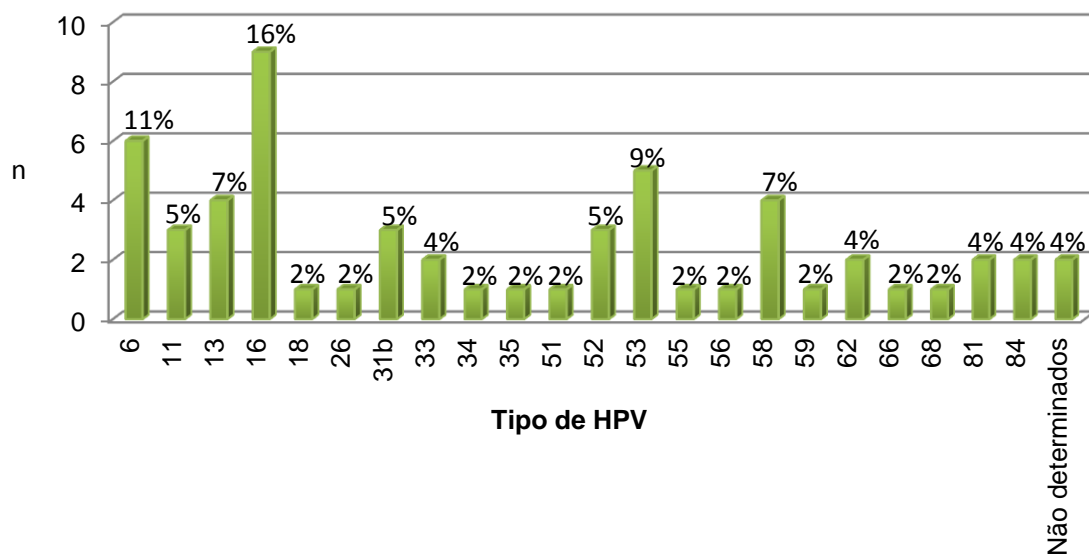


Gráfico 4. Frequência dos tipos de HPV em mulheres soronegativas para HIV.

Tabela 3. Frequência dos tipos de HPV em mulheres soropositivas e soronegativas para HIV.

	Tipos de HPV	HIV+ n (%)	HIV- n (%)
Baixo Risco	HPV 6	4 (6,5%)	6 (10,5%)
	HPV 11	6 (9,7%)	3 (5,3%)
	HPV 13	-	4 (7%)
	HPV 32	1 (1,6%)	-
	HPV 34	-	1 (1,7%)
	HPV 42	1 (1,6%)	-
	HPV 44	2 (3,2%)	-
	HPV 55	1 (1,6%)	1 (1,7%)
	HPV 61	3 (4,8%)	-
	HPV 62	2 (3,2%)	2 (3,5%)
	HPV 64	1 (1,6%)	-
	HPV 71	2 (3,2%)	-
	HPV 81	2 (3,2%)	2 (3,5%)
	HPV 83	4 (6,5%)	-
	HPV 84	-	2 (3,5%)
Alto Risco	HPV 16	7 (11,3%)	9 (15,8%)
	HPV 18	2 (3,2%)	1 (1,7%)
	HPV 26	-	1 (1,7%)
	HPV 31	5 (8%)	-
	HPV 31b	1 (1,6%)	3 (5,3%)
	HPV 33	2 (3,2%)	1 (1,7%)
	HPV 35	-	1 (1,7%)
	HPV 51	2 (3,2%)	1 (1,7%)
	HPV 52	-	3 (5,3%)
	HPV 53	5 (8%)	5 (8,8%)
	HPV 56	1 (1,6%)	1 (1,7%)
	HPV 58	1 (1,6%)	4 (7%)
	HPV 59	1 (1,6%)	1 (1,7%)
	HPV 66	3 (4,8%)	1 (1,7%)
	HPV 68	2 (3,2%)	1 (1,7%)
HPV 82	1 (1,6%)	-	
	Não Identificado	-	2 (3,5%)

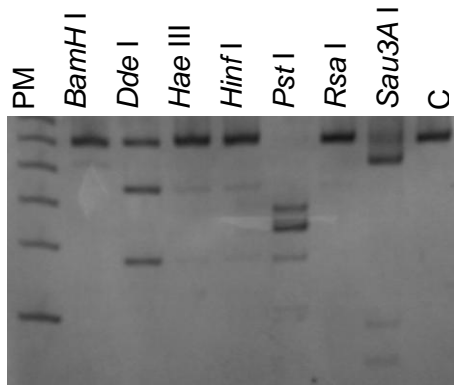
Das 85 amostras cujo tipo de HPV infeccioso foi determinado, 23,5% (n=20) apresentaram coinfeção: um caso com seis tipos distintos de HPV, sete casos com três tipos distintos e doze com dois tipos distintos (Quadro 11). Quatro casos de coinfeção apresentaram apenas tipos de HPV de alto risco, cinco casos apenas tipos de baixo risco e 11 casos apresentaram tipos de alto e baixo risco de HPV (Quadro 11).

Sessenta por cento dos casos de coinfeção (12/20) aconteceram em mulheres soropositivas para HIV, um deles com seis tipos distintos, quatro deles com três tipos distintos e sete com dois tipos distintos. Desses casos, dois apresentaram apenas tipos de alto risco, três com apenas tipos de baixo risco e sete com tipos de baixo e alto risco. Os tipos e frequência de coinfeção nas mulheres HIV positivas estão descritas no Quadro 11

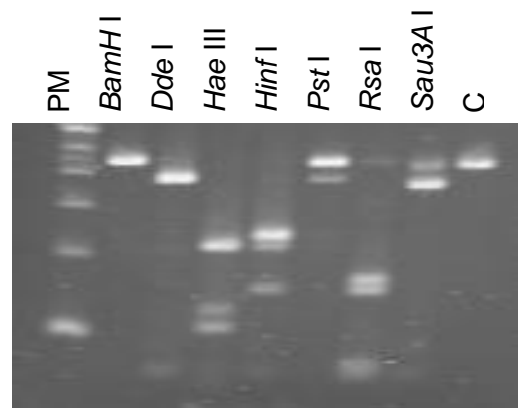
As mulheres soronegativas para HIV representaram 40% dos casos de coinfeção dos 20 detectados (8/20), três deles apresentaram três tipos distintos e cinco apresentaram dois tipos distintos. Desses seis casos dois apresentaram apenas tipos de HPV de alto risco, dois apresentaram tipos de baixo risco e quatro tipos de alto e baixo risco. Os tipos e frequência de coinfeção nas mulheres HIV negativas estão descritas no Quadro 11.

Quadro 12. Distribuição dos tipos de HPV em coinfeção e frequência de coinfeção nas mulheres HIV positivas e negativas testadas por RFLP e hibridização reversa em linha (RLB).

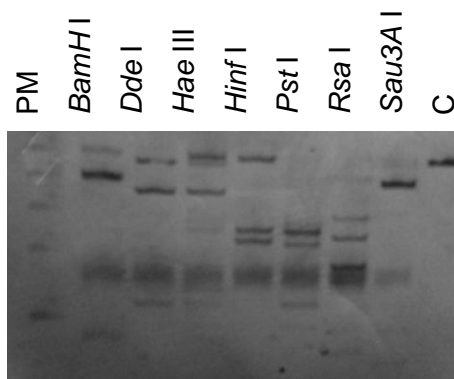
Pacientes	Tipos em Coinfeção
HIV +	56+71 11+ 81 16+31 6+61 6+62 6+31 51+83 16+31+33 18+44+82 11+42+66 31+58+83 16+44+51+53+55+68
HIV -	6+11 16+53 6+55 13+26 51+53 11+53+62 13+16+52 6+18+58



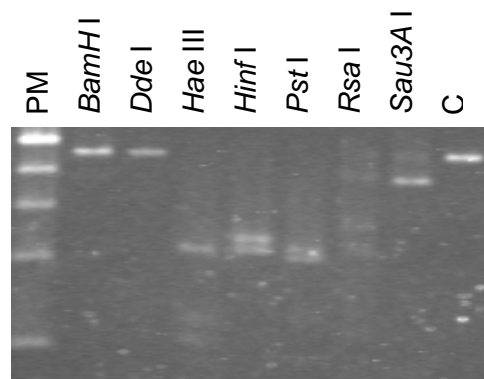
a) Perfil de bandas do HPV16.



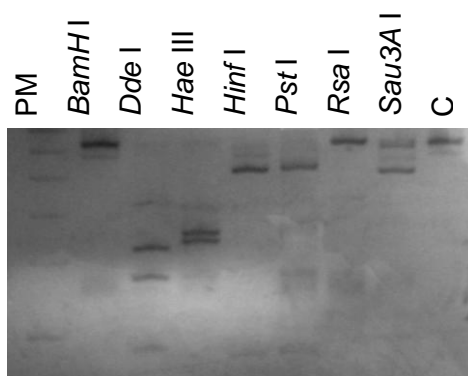
d) Perfil de bandas do HPV 6b.



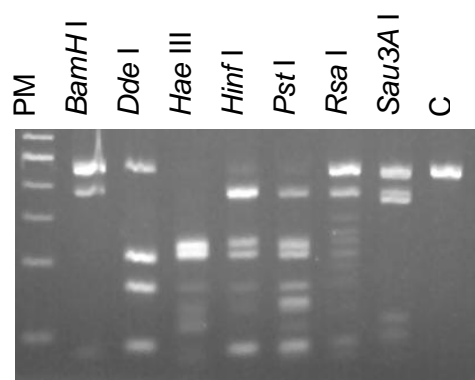
b) Perfil de bandas do HPV 13



e) Perfil de bandas do HPV 11.



c) Perfil de bandas do HPV 53.



f) Perfil de bandas dos HPV 11, 53 e 62.

Figura 10. Eletroforese dos produtos de digestão após tratamento com as enzimas de restrição *BamHI* *DdeI* *HaeIII* *HinfI* *PstI* *RsaI* *Sau3AI* demonstrando os tipos 6b, 11, 13, 16, 53 e 62. Figuras a-c Gel de poliacrilamida corado com Nitrato de Prata. Figuras d-f: Gel de agarose 1,5%, corado com EtBr. PM= 100 pb.

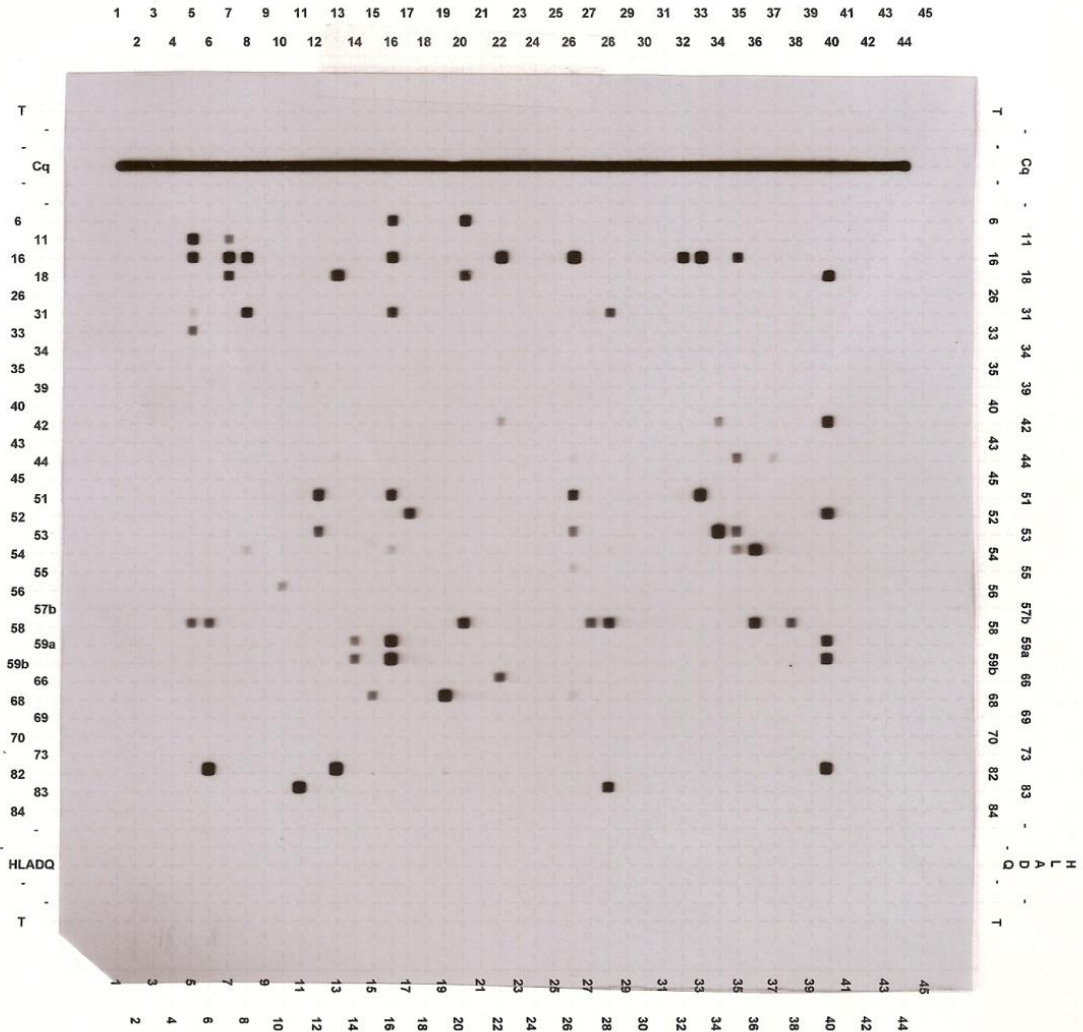


Figura 11. Placa radiográfica correspondente à membrana de Hibridização Reversa em Linha demonstrando os tipos de HPV detectados. À esquerda e à direita da membrana estão listados os tipos de HPV para os quais contém a sonda correspondente de detecção. Acima e abaixo da membrana se encontram a sequência de amostras de HPV amplificadas com iniciadores PGMY09/11 biotinilados. Na intercessão entre as linhas, observa-se o(s) tipo(s) detectado(s) para cada amostra.

5.3 CITOLOGIA

Das 87 amostras envolvidas no estudo oito eram de mulheres com alterações citológicas; quatro de mulheres soropositivas para HIV e quatro de mulheres soronegativas. As alterações citológicas assim como os tipos de HPV presentes e a coinfeção ou não por HIV estão representadas na Tabela 4. As 79 amostras restantes foram de mulheres que apresentavam citologia normal ou alterações celulares benignas.

Tabela 4. Descrição das alterações citológicas, tipos de HPV presentes com identificação deles em baixo (LR) e alto risco (HR) e perfil sorológico para HIV.

Citologia*	Tipo de HPV (LR/HR)**	HIV
LIE baixo grau	6 (LR)	Negativo
LIE baixo grau	33 (HR)	Negativo
LIE baixo grau	13 (LR)	Negativo
LIE baixo grau	66 (HR)	Positivo
ASCUS	31 (HR)	Positivo
Alteração Inflamatória	16, 44, 51, 53, 55, 68 (LR/HR)	Positivo
HPV	51 e 53 (HR)	Negativo
Alteração Inflamatória	31, 58, 83 (LR/HR)	Positivo

*LIE baixo grau: Lesão Intraepitelial Escamosa de baixo grau; ASCUS: Atipias de Células Escamosas de Significado Indeterminado.

**LR: Low Risk; HR: High Risk

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A determinação dos tipos de HPV circulantes em diferentes regiões geográficas é de grande importância, especialmente quanto a eficácia do uso das vacinas bi e quadrivalentes disponíveis para comercialização (Harper et al., 2006; Villa et al., 2006). Na região do Espírito Santo existem poucos estudos que pesquisaram os tipos de HPV, e eles foram realizados utilizando um pequeno número de amostras (Freitas et al., 2009) ou utilizando PCR com iniciadores específicos para apenas sete tipos distintos (Lima et al., 2009). Neste estudo, foi utilizado maior número de amostras e as técnicas RFLP, que é capaz de detectar 44 tipos de HPV, e RLB, capaz de identificar 32 tipos de HPV que infectam a mucosa genital.

A técnica de RFLP é de fácil realização e a sensibilidade do teste é alta, de 99,5% (Gutiérrez-Xicoténcatl et al., 2009). Uma grande quantidade de tipos distintos de HPV (44 tipos) pode ser identificada, assim como podem ser identificados tipos novos pela RFLP. Porém em casos de coinfeção e de digestão parcial das enzimas (quando as enzimas digerem de forma parcial o DNA não apresentando todas as bandas esperadas) sua análise é dificultada. A metodologia de RLB, embora constituída por diversas etapas, é também uma metodologia exequível, as membranas podem ser reutilizadas por até 15 vezes sem perda de sinal (van den Brule et al., 2002) e a leitura do resultado é simples. A sensibilidade do teste é de 10 – 100 cópias de DNA por PCR, podendo haver pequena reação cruzada entre tipos (Gutiérrez-Xicoténcatl et al., 2009). Pode-se identificar um grande número de tipos de HPV que infectam mucosa (32 tipos) e até 42 amostras são testadas por membrana. Estas duas metodologias foram utilizadas no presente estudo, de modo complementar, ou seja, para casos em que o produto da PCR utilizando iniciadores consensuais MY09/11 foram insuficientes para observar os fragmentos após a digestão enzimática, a técnica de RLB foi aplicada.

Então, a partir de amostras cervicais de mulheres soropositivas e soronegativas para HIV, conhecidamente positivas para HPV, foram determinados os tipos além de infecção mista por HPV, após reamplificação do

HPV com iniciadores consensuais em volume de reação que permitiria a análise de tipos.

Este estudo possibilitou revelar uma grande diversidade de tipos de HPV infectando as mulheres soropositivas e soronegativas para HIV. Estudos realizados em diferentes regiões do Brasil encontraram também uma grande variedade de tipos, variando de 13 a 26 (Levi et al., 2002; Camara et al., 2003; Cerqueira et al., 2007; Paesi et al., 2009; Trottier et al., 2006; Queiroz et al., 2004; Oliveira et al., 2010). Na África do Sul, Said et al. (2009) encontraram 26 tipos distintos e Stevens et al. (2009) na Austrália encontraram 37 tipos de HPV distintos. O número de tipos encontrados pode variar de acordo com a distribuição regional dos diferentes tipos de HPV e com as técnicas de genotipagem utilizadas, ou seja, estudos que utilizam técnicas capazes de detectar maior número de tipos tendem a evidenciar um número maior de tipos.

Dentre os tipos detectados foi observada uma alta frequência para o HPV16 (14%). Embora diferentes tipos de HPV apresentem distribuição geográfica variável (Clifford et al., 2005), o HPV16 é usualmente o tipo mais prevalente na maioria das regiões da América do Sul, Ásia e Europa em geral, assim como no Brasil onde foram descritos em prevalência variando de 13,9% a 73% (Camara et al., 2003; Rabelo-Santos et al., 2003; Queiroz et al., 2004; Clifford et al., 2005; Trottier et al., 2006; Campos et al., 2008; Oliveira et al., 2008; Paesi et al., 2009; Silva et al., 2009). Na África Sub Saariana o HPV16 é ou foi descrito em um estudo como o segundo tipo mais prevalente (Clifford et al., 2005) e vários estudos em diferentes regiões do mundo mostram prevalência variada, todavia normalmente alta (10%-22,5%) para este tipo de HPV (Levi et al., 2002; Dutra et al., 2008; Menton et al., 2009, Said et al., 2009; Watt et al., 2009).

O presente estudo demonstrou o HPV16 como o tipo mais prevalente tanto entre as mulheres HIV positivas quanto nas mulheres HIV negativas. Entretanto, estudos têm mostrado que mulheres soropositivas para HIV frequentemente são infectadas por outros tipos de HPV de alto risco, como os tipos 52 e 58, em prevalência maior do que as dos tipos 16 e 18 (La Ruche et al., 1998; Levi et al., 2002, 2004; Luque et al., 2006; Blossom et al., 2007).

Essa diferença pode se dever à característica de distribuição regional deste tipo de HPV. A alta prevalência do HPV16 em mulheres negativas para HIV tem sido descrita, e este tipo é responsável por 55% dos casos de câncer cervical no mundo (Smith et al., 2007). Além disso, uma grande variedade de tipos de alto risco, diferentes dos tipos 16 e 18, também foram encontrados nos dois grupos de mulheres, como os tipos de HPV 31 e 53.

No presente estudo frequência similar de tipos de HPV de alto risco foram encontrados nas duas populações (64% vs 63%). Como as mulheres soropositivas para HIV são susceptíveis a infecções oportunistas além de levarem mais tempo para clarificar as infecções por HPV associadas a parceiros não fixos, não surpreende que mais tipos de HPV sejam mais prevalentes nessas mulheres (McKenzie et al., 2009). A grande maioria dos estudos mostra que indivíduos infectados por HIV apresentam maior prevalência de tipos de HPV de alto risco (Motti et al., 1996; La Ruche et al., 1999; Tanzi et al., 2009). Minkoff et al. (1998) reportaram uma frequência de tipos oncogênicos três vezes maior em mulheres HIV positivas. O número semelhante de tipos de alto risco entre as mulheres HIV positivas e negativas não implica em baixo número de tipos de alto risco entre as mulheres HIV positivas, e sim a grande número de tipos de alto risco dentre as mulheres HIV negativas, já que são mulheres atendidas em Centro de Referência em DST/AIDS. Como trata-se de mulheres que apresentaram outras DSTs (56%) e alto número de parceiros sexuais (média de 15 parceiros na vida por paciente) isto aumenta a possibilidade de múltiplas infecções, inclusive por tipos de alto risco.

Nas mulheres HIV positivas existe um aumento no risco de infecção por HPV e de lesões intraepiteliais escamosas, o precursor do cancer cervical (Rabkin et al., 1993; Sun et al., 1997). Neste estudo, os casos de lesões intraepiteliais escamosas foi igual nas mulheres soropositivas e soronegativas para HIV, fato também observado por Luchters et al. (2010). Além do mais, cinco dos oito casos com alterações foram infectados por apenas um tipo de HPV, um fato que não é incomum, conforme observado por Fernandes et al. (2008) que reportaram infecção simples em mais da metade dos casos de alterações citológicas.

A maior parte das mulheres com lesões cervicais foi infectada por tipos de HPV de alto risco, o que torna ainda mais importante o tratamento e acompanhamento de evolução e cura dessas mulheres, já que a infecção por estes tipos de HPV podem levar ao desenvolvimento de cancer cervical, especialmente naquelas mulheres coinfetadas pelo HIV e que apresentaram maior número de tipos de HPV. Além disso, é interessante que muitos casos com citologia normal também estavam associados à infecção por tipos de HPV de alto risco, o que pode sugerir que as anormalidades citológicas se resolvam antes da resolução da infecção por tipos de HPV de alto risco (Schiffman et al., 2002), que tenha havido infecção subsequente a uma cura, ou ainda mesmo que não haveria formação de lesão, já que a maioria das infecções são assintomáticas (Huang, 2008). As mulheres positivas para HIV apresentam uma chance maior de desenvolverem infecção persistente, que pode se manter assintomática por período indeterminado não sendo observadas pelo Papanicolaou, método de diagnóstico mais utilizado para identificação de infecções por HPV, e podendo vir a causar lesões de alto grau a câncer invasivo, como já mencionado anteriormente. Tudo isso deixa claro a importância do acompanhamento das mulheres soropositivas para HIV quando apresentam lesões e quando infectadas por tipos de alto risco de HPV, e ainda a importância de seguimento das mulheres HIV positivas com citologia normal e a necessidade de utilização de técnicas de identificação da infecção pelo HPV e sua genotipagem por métodos moleculares.

Os tipos mais prevalentes depois do HPV16 foram HPV6 e 53 (8,4% cada tipo) e HPV11 (7,7%), que são normalmente detectados em estudos no Brasil (Levi et al., 2002; Camara et al., 2003; Rabelo-Santos et al., 2003; Queiroz et al., 2004; Tozetti et al., 2006; Campos et al., 2008; Oliveira et al., 2008; Grinsztejn et al., 2009; Paesi et al., 2009), porém menos frequentes em outros países como África do Sul, Jamaica, Austrália e Irlanda (Menton et al., 2009; Said et al., 2009; Stevens et al., 2009; Watt et al., 2009).

A taxa de tipos indeterminados encontrada neste estudo foi baixa (1,7%), o que se deve às técnicas utilizadas, RFLP e RLB, capazes de detectar 44 e 32 dos 50 tipos de HPV que infectam mucosa, respectivamente, conforme anteriormente descrito. As duas amostras cujo tipo infectante não foi

determinado foram testadas somente por RFLP. Estudos utilizando esta mesma metodologia encontram taxas de 4,3% a 36,4% de tipos indeterminados (Freitas et al., 2009 ; Paesi et al., 2009; Oliveira et al., 2010). A percentagem de tipos indeterminados foi ainda mostrada variar de 4,2% a 45,1% com as seguintes técnicas: (i) AMPLICOR, metodologia baseada em PCR capaz de detectar 13 tipos de HPV de alto risco, apresentou taxa de 4,2% de tipos indeterminados (Watt et al., 2009); (ii) *Dot Blot Hybridization*, com sondas para 17 tipos de HPV de alto risco e 26 tipos de HPV de baixo risco, apresentou taxa de tipos não identificados de 2,9% (Herrero et al., 2005); *Linear Array*, capaz de detectar 37 tipos distintos de HPV, não foi capaz de identificar 6,7% dos tipos de HPV nas amostras cervicais (Ragin et al., 2007); (iv) *Kit Papillomavirus Clinical Arrays®*, capaz de identificar 35 tipos distintos de HPV, deixou de identificar 23,53% dos tipos de HPV (Dutra et al., 2008) e; (v) a utilização de PCR com iniciadores específicos para sete tipos distintos de HPV apresentou 45,1% de tipos indeterminados (Lima et al., 2009) e para oito tipos distintos apresentou 25,8% de tipos indeterminados (Silva et al., 2009). Isso mostra que as diferentes taxas de tipos não identificados entre diversos estudos podem ser devidas às diferentes metodologias empregadas e à diversidade de tipos que estas técnicas são capazes de identificar. Por outro lado, as diferenças encontradas entre estudos que utilizam a mesma técnica podem se dever tanto à característica de distribuição geográfica dos tipos de HPV, quanto ao número de casos de infecções mistas, que no caso da técnica de RFLP, soma-se a dificuldade de análise do padrão de restrição e consequentemente a identificação dos tipos de HPV presentes. Além disso, novos tipos virais podem ser detectados por esta metodologia que até o seu seqüenciamento e análise permanecerão como tipos indeterminados.

Ainda, as duas amostras que não tiveram seus tipos determinados foram pesquisadas pela técnica de RFLP, o que também se pode dever ao grande número de bandas presentes em uma possível co-infecção cuja técnica não permitiu a identificação dos tipos.

Dentre os 31 tipos distintos de HPV encontrados neste estudo, inesperadamente o HPV13 foi detectado em 3% das amostras. Este é um tipo incomum de baixo risco, relacionado ao HPV6 (de Villiers et al., 2004; Herrero

et al., 2005), reconhecidamente associado com hiperplasia epitelial focal (Beaudenon et al., 1987) e raramente encontrado infectando o trato genital. Illades-Aguiar (2010), no México, encontrou este tipo em 0,1% de suas amostras com lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau. Esta baixa percentagem de HPV13 pode ser parcialmente explicada pelo fato de que várias técnicas de genotipagem de HPV não são capazes de determinar este tipo, como RLB e *Linear Array*, ou ainda pode se dever a distribuição incomum deste tipo. É importante ressaltar que as amostras identificadas com o HPV13 apresentaram perfil de restrição enzimático parcial, porém não possível de identificação com nenhum outro tipo que não o tipo 13. Infelizmente, as amostras de secreção cervical utilizadas no estudo não foram suficientes para que fosse realizado o seu seqüenciamento e confirmação desse tipo de HPV. Além disso, a metodologia RLB, também usada neste estudo, não contempla sonda para detecção deste tipo.

O HPV32 foi encontrado em 1% das amostras no presente estudo e, assim como o HPV13, é a principal causa de hiperplasia epitelial focal (Beaudenon et al., 1987). Por outro lado, este tipo é mais comumente encontrado infectando o trato genital (Palefsky et al., 1999; Herrero et al., 2005; Cerqueira et al., 2007; Illades-Aguiar et al., 2010) inclusive na região deste estudo (Freitas et al., 2009).

No presente estudo 23,5% das amostras apresentavam coinfeção com tipos distintos de HPV e o número desses casos foi maior entre as mulheres HIV-positivas do que nas HIV-negativas (12 vs 8). O número máximo de tipos encontrados por amostra foi de seis; outros estudos mostram números similares de infecções múltiplas em mulheres HIV-positivas (Desruisseau et al., 2009; Tanzi et al., 2009). Em contraste, Levi et al. (2002) demonstraram 78,9% de infecções múltiplas com até 10 tipos distintos de HPV em mulheres HIV-positivas atendidas em centros especializados, das quais 89,5% apresentavam alterações citológicas. É importante salientar que grandes números de tipos encontrados em coinfeção por metodologias de hibridização, como a RLB, pode se dever a ligações inespecíficas entre sondas para um tipo de HPV com o DNA de outro tipo.

O número relativamente baixo de casos de co-infecção encontrados neste estudo pode se dever ao fato de que a maior parte das amostras (n= 77) foi genotipada por RFLP, técnica que permite uma identificação limitada dos tipos em casos de co-infecção. Esta técnica permitiu a identificação de no máximo três tipos distintos de HPV em uma mesma amostra enquanto a RLB foi capaz de determinar a presença de até seis tipos distintos. Esse fato pode também explicar a detecção de dois tipos diferentes detectados na mesma amostra pelas duas técnicas, na qual a RFLP detectou os tipos 13, 16 e 58 e a hibridização reversa em linha detectou os tipos 6, 18 e 58. Nesse caso, as bandas presentes no gel de RFLP não correspondiam às dos tipos 6 e 18, enquanto o tipo 13 não é pesquisado pela hibridização reversa em linha. A detecção em uma mesma amostra do HPV13 por RFLP e do HPV6 por RLB sem ter sido evidenciado este último tipo por RFLP, sugere que tenha ocorrido uma reação cruzada pela técnica de RLB, visto que estes tipos são muito relacionados entre si. Metodologias de hibridização podem apresentar reações cruzadas entre diferentes tipos de HPV (Gutiérrez-Xicoténcatl et al., 2009).

As mulheres que apresentaram infecção por mais de um tipo de HPV e aquelas com apenas um tipo de HPV tiveram número alto e semelhante de parceiros sexuais na vida (17 vs 15 e variou de 2 a 200, dados não apresentados). Esse número de parceiros nas mulheres coinfectedas já é esperado já que elas se expõem a um risco maior de infecções por fontes que podem carrear diferentes tipos de vírus. Essas mulheres devem também ter um maior acompanhamento, assim como orientação quanto sua proteção com uso de preservativos, já que estão expostas não apenas a mais tipos de HPV, que podem levar ao desenvolvimento de lesões cervicais e câncer cervical, mas também infecção por outros vírus, bactérias e fungos que podem auxiliar na progressão dessas lesões.

Até o momento, existem duas vacinas aprovadas e liberadas para comercialização; uma quadrivalente, contra os tipos de HPV 6, 11, 16 e 18 (Gardasil®), e uma bivalente, com proteção para infecção dos tipos de HPV 16 e 18 (Cervarix®) (Harper et al., 2006; Villa et al., 2006). Os resultados obtidos neste estudo revelam que 73% das mulheres não seriam protegidas pela vacina quadrivalente e 84% delas não seriam protegidas pela vacina bivalente,

não considerando a chance de proteção cruzada com outros tipos de HPV filogeneticamente próximos. A proteção cruzada foi descrita para os tipos de HPV31, HPV33 e HPV45, tipos relacionados com HPV16 e HPV18, porém as vacinas não são licenciadas para tais tipos (Bonanni et al., 2009; Paavonen et al., 2009) e estudos a respeito de proteção cruzada são limitados pelo tempo e amplitude da utilização da vacina, comprometendo conclusões sobre esse assunto. Ainda, neste estudo foi encontrada grande diversidade de tipos, inclusive tipos pouco encontrados infectando trato genital, como o HPV13, demonstrando uma distribuição de tipos característica da localidade e da população estudada. Com tudo isso, torna-se clara a necessidade de estudos de determinação dos tipos de HPV em diversas regiões e diferentes populações, não apenas para predição da eficácia das vacinas licenciadas para comercialização, mas também de crucial importância para o desenvolvimento de segunda geração de vacinas em futuro próximo, para melhor determinação de prognóstico e monitoramento das mulheres, assim como para definir políticas de saúde específicas para população feminina infectada por HIV.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- a) Uma grande variedade de tipos de HPV foi detectada tanto entre as mulheres soropositivas quanto nas mulheres soronegativas para HIV.
- b) Taxas similares foram encontradas entre os números de tipos de HPV nas mulheres soropositivas e soronegativas para HIV.
- c) Tipos de baixo e alto risco foram determinados nas duas populações de mulheres.
- d) O HPV16 se mostrou o tipo mais prevalente entre as mulheres tanto soropositivas e quanto soronegativas para HIV.
- e) O HPV13, incomum em infecções do trato genital foi detectado apenas entre as mulheres soronegativas para HIV.
- f) O número de casos de coinfeção assim como o número de tipos diferentes em coinfeção foi maior entre as mulheres soropositivas para HIV.
- g) HPV de alto risco foi encontrado em mulheres com citologia normal e alterada.

8 PERSPECTIVAS

- a) Analisar os tipos de HPV presentes em população geral do estado.
- b) Realizar acompanhamento das mulheres soropositivas e soronegativas para HIV que foram positivas para tipos de HPV de alto risco com ou sem lesão para que se possa inferir sobre a evolução desses casos.
- c) Analisar a integração do genoma do HPV dos tipos mais prevalentes na região, para que se possa discutir a respeito da importância desse mecanismo na evolução da infecção e do desenvolvimento de lesões causadas pelo vírus.
- d) Estudar as variantes do HPV 16 presentes na região e correlaciona-las com a citologia.

9 REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

Ahdieh L, Klein RS, Burk R, Cu-uvin S, Schuman P, Duerr A, Safaeian M, Astemborski J, Daniel R, Shah K. Prevalence, incidence, and type-specific persistence of human papillomavirus in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative women. *J Infect Dis.* 2001. 184: 682-690.

Alexander M, Salgaller ML, Celis E, Sette A, Barnes WA, Rosenberg SA, Steller MA. Generation of tumor-specific cytolytic T lymphocytes from peripheral blood of cervical cancer patients by in vitro stimulation with a synthetic human papillomavirus type 16 E7 epitope. *Am J Obstet Gynecol.* 1996. 175: 1586-1593.

Arroyo M, Bagchi S, Raychaudhuri P. Association of the human papillomavirus type 16 E7 protein with the S-phase E2F/cyclin complex. *Mol Cell Biol.* 1993. 13: 6537–6546.

Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, Olson C, Brown JC. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and threedimensional image reconstruction. *Biophys J.* 1991. 60: 1445-1456.

Band V, Dalal S, Delmolino L, Androphy EJ. Enhanced degradation of p53 protein in HPV-6 and BPV-1 E6-immortalized human mammary epithelial cells. *EMBO J.* 1993. 12: 1847–1852.

Barksdale SK, Baker CC. Differentiation-specific expression from the bovine papillomavirus type 1 P2443 and late promoters. *J Virol.* 1993. 67: 5605-5616.

Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol.* 2005. 32: Suppl 1: S16–24.

Bauer HM, Ting Y, Greer CE, Chambers JC, Tashiro CJ, Chimera J, Reingold A, Manos MM. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA.* 1991. 265(4): 472-477.

Beaudenon S, Praetorius F, Kremsdorf D, Lutzner M, Worsaae N, Pehau-Arnaudet G, Orth G. A new type of human papillomavirus associated with oral focal epithelial hyperplasia. *J Invest Dermatol.* 1987. 88 (2): 130-135.

Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong C, Villa LL, Delius H, Peyton CL, Bauer HM, Wheeler CM. 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. 170: 1077-1085.

Bird G, O'Donnell M, Moroianu J, Garcea RL. A possible role for cellular karyopherins in regulating polyomavirus and papillomavirus capsid assembly. *J Virol.* 2008. 82: 9848-9857.

Blossom DB, Beigi RH, Farrell JJ, Mackay W, Qadadri B, Brown DR, Rwambuya S, Walker CJ, Kambugu FS, Abdul-Karim FW, Whalen CC, Salata RA. Human papillomavirus genotypes associated with cervical cytologic abnormalities and HIV infection in Ugandan women. *J Med Virol.* 2007. 79 (6): 758-765.

Bonanni P, Boccalini S, Bechini A. Efficacy, duration of immunity and cross protection after HPV vaccination: a review of the evidence. *Vaccine.* 2009. 27 Suppl 1: A46-53.

Boom R, Sol C, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-Van Dillen PM, Van Der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990. 28 (3), 495-503.

Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman M H, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst.* 1995. 87: 796-802.

Bosch FX, De Sanjosé S, Castellsagué X. Vírus de papiloma humano: riesgo oncogenico y nuevas oportunidades para la prevencion. *An Sist Sanit Navar.* 2001. 24: 7-14.

T Hancock R. A highly sensitive technique for staining DNA and RNA in polyacrylamide gels using silver. *J Biochem Biophys Methods*. 1981. 5 (4): 219-28.

Boyer S N, Wazer DE, Band V. E7 protein of human papilloma virus 16 induces the degradation of retinoblastoma protein through ubiquitin–proteasome pathway. *Cancer Res*. 1996. 56: 4620–4624.

Brehm A, Nielsen SJ, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J*. 1999. 18: 2449–2458.

Brown DR, Kitchin D, Qadadri B, Neptune N, Batteiger T, Ermel A. The human papillomavirus type 11 E1–E4 protein is a transglutaminase 3 substrate and induces abnormalities of the cornified cell envelope. *Virology*. 2006. 345: 290-298.

Bryan JT, Brown DR. Association of the human papillomavirus type 11 E1/E4 protein with cornified cell envelopes derived from infected genital epithelium. *Virology*. 2000. 277: 262-269.

Buck CB, Thompson CD, Pang YY, Lowy DR, Schiller JT. Maturation of papillomavirus capsids. *J Virol*. 2005. 79: 2839-2846.

Caberg JH, Hubert PM, Begon DY, Longworth MS, Laimins LA. The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J. Virol*. 2004. 78: 3533–3541.

Camara GN, Cerqueira DM, Oliveira AP, Silva EO, Carvalho LG, Martins CR. Prevalence of human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions in the Federal District of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003. 98879-98883.

Campos EA, Simões JA, Rabelo-Santos SH, Sarian LO, Pitta DR, Levi JE, Derchain S. Recovery of DNA for the detection and genotyping of human papillomavirus from clinical cervical specimens stored for up to 2 years in a

universal collection medium with denaturing reagent. *J Virol Methods*. 2008. 147 (2): 333-337.

Cardillo M, Hagan R, Abadi J, Abadi MA. CD4 T-cell count, viral load, and squamous intraepithelial lesions in women infected with the human immunodeficiency virus. *Cancer*. 2001. 93: 111-114.

Carter JJ, Wipf GC, Hagensee ME, McKnight B, Habel LA, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N, Daling JR, Koutsky LA, et al. Use of human papillomavirus type 6 capsids to detect antibodies in people with genital warts. *J Infect Dis*. 1995. 172: 11-18.

Carter JJ, Koutsky LA, Wipf GC, Christensen ND, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N, Galloway DA. The natural history of human papillomavirus type 16 capsid antibodies among a cohort of university women. *J Infect Dis*. 1996. 174: 927-936.

Castle PE, Gravitt PE, Solomon D, Wheeler CM, Schiffman M. Comparison of linear array and line blot assay for detection of human papillomavirus and diagnosis of cervical precancer and cancer in the atypical squamous cell of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesion triage study. *J Clin Microbiol*. 2008. 46 (1): 109-117.

CDC - NPIN (National Prevention Information Network), 2008. Disponível em: <<http://www.cdcnpin.org/scripts/std/std.asp>> Acesso em: 12 jul 2010.

Cerqueira DM, de S Moraes D, Camara GN, Amaral FA, Oyama CN, dos Santos MQ, Martins CR. High HPV genetic diversity in women infected with HIV-1 in Brazil. *Arch Virol*. 2007. 152 (1): 75-83.

Chiasson MA, Ellerbrock TV, Bush TJ, Sun XW, Wright TCJr. Increased prevalence of vulvovaginal condyloma and vulvar intraepithelial neoplasia in women infected with the human immunodeficiency virus. *Obstet Gynecol*. 1997. 89: 690-694.

Cheah PL, Looi LM. Biology and pathological associations of the human papillomaviruses: a review. *Malays J Pathol*. 1998. 20: 1-10.

Cheng YW, Wu MF, Wang J, Yeh KT, Goan YG, Chiou HL, Chen CY, Lee H. Human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein is expressed in lung cancer and related with p53 inactivation. *Cancer Res.* 2007. 67: 10686–10693.

Cho YS, Kang JW, Cho M, Cho CW, Lee S, Choe YK, Kim Y, Choi I, Park SN, Kim S, Dinarello CA, Yoon DY. Down modulation of IL-18 expression by human papillomavirus type 16 E6 oncogene via binding to IL-18. *FEBS Lett.* 2001. 501: 139-145.

Choe J, Vaillancourt P, Stenlund A, Botchan M. Bovine papillomavirus type 1 encodes two forms of a transcriptional repressor: structural and functional analysis of new viral cDNAs. *J Virol.* 1989. 63: 1743–1755.

Chow LT, Broker TR. SamII DNA tumor viruses. In: Nathanson N, ed. *Viral Pathogenesis*. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1997. 267-301.

Chromy LR, Pipas JM, Garcea RL. Chaperone-mediated in vitro assembly of Polyomavirus capsids. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003. 100: 10477-10482.

Chromy LR, Oltman A, Estes PA, Garcea RL (2006). Chaperone-mediated in vitro disassembly of polyoma- and papillomaviruses. *J Virol.* 2006. 80: 5086-5091.

Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2003. 88: 63–73.

Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, Anh PT, Ferreccio C, Hieu NT, Matos E, Molano M, Rajkumar R, Ronco G, de Sanjosé S, Shin HR, Sukvirach S, Thomas JO, Tunsakul S, Meijer CJ, Franceschi S, IARC HPV Prevalence Surveys Study Group. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet.* 2005. 366 (9490): 991-998.

Coleman N, Birley HD, Renton AM, Hanna NF, Ryaite BK, Byrne M, Taylor-Robinson D, Stanley MA. Immunological events in regressing genital warts. *Am J Clin Pathol.* 1994. 102: 768-774.

Coleman N, Stanley MA. Characterization and functional analysis of the expression of vascular adhesion molecules in human papillomavirus-related disease of the cervix. *Cancer*. 1994. 74: 884-892.

Cooper B, Brimer N, Vande Pol SB. Human papillomavirus E6 regulates the cytoskeleton dynamics of keratinocytes through targeted degradation of p53. *J Virol*. 2007. 81: 12675–12679.

Correnti M, Cavazza ME, Bajares M, Bello J, Cerruti R, Acosta H et al. Detección de virus papiloma humano (VPH) mediante biología molecular y su asociación con neoplasia cervical uterina. *Rev Venez Oncol*. 1997. 9: 76-83.

Crook T, Tidy JA, Vousden KH. Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. *Cell*. 1991. 67: 547–556.

Cutts FT, Franceschi S, Goldie S, Castellsague X, de Sanjose S, Garnett G, Edmunds WJ, Claeys P, Goldenthal KL, Harper DM, Markowitz L. Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. *Bull World Health Organ*. 2007. 85 (9): 719-726.

Cuzick J, Terry G, Ho L, Hollingworth T, Anderson M. Type-specific human papillomavirus DNA in abnormal smears as a predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer*. 1994. 69:167-171.

Danos O, Katinka M, Yaniv M. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J*. 1982. 1: 231–236.

Day PM, Lowy DR, Schiller JT: Papillomaviruses infect cells via a clathrin-independent pathway. *Virology*. 2003. 307: 1-11.

Day PM, Lowy DR, Schiller JT. Heparan sulfate-independent cell binding and infection with furin pre-cleaved papillomavirus capsids. *J Virol*. 2008. 82: 12565–12568.

Day PM, Gambhira R, Roden RB, Lowy DR, Schiller JT. Mechanisms of human papillomavirus type 16 neutralization by L2 cross-neutralizing and L1 type-specific antibodies. *J Virol.* 2008. 82: 4638–4646.

de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol.* 1995. 76 (Pt 4): 1057-1062.

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004. 324: 17–27.

Desruisseau AJ, Schmidt-Grimminger D, Welty E. Epidemiology of HPV in HIV-positive and HIV-negative fertile women in Cameroon, West Africa. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2009. 810596: 1-6.

Dillner J. The serological response to papillomaviruses. *Semin Cancer Biol.* 1999. 9: 423-430.

Dimova DK, Dyson NJ. The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene.* 2005. 24: 2810-2826.

Dollard SC, Wilson JL, Demeter LM, Bonnez W, Reichman RC, Broker TR, Chow LT. Production of human papillomavirus and modulation of the infectious program in epithelial raft cultures. *Genes Dev.* 1992. 6: 1131-1142.

Doorbar J, Campbell D, Grand RJ, Gallimore PH. Identification of the human papilloma virus-1a E4 gene products. *EMBO J.* 1986. 5: 355-362.

Doorbar, J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature.* 1991. 352: 824–827.

Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005. 32 (Suppl 1): S7-15.

Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci.* 2006. 110: 525-541.

Duensing S & Munger K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Res.* 2002. 62: 7075–7082.

Dutra I, Santos MR, Soares M, Couto, AR, Bruges-Armas M, Teixeira F, Monjardino L, Hodgson S, Bruges-Armas J. Characterization of human papillomavirus (HPV) genotypes in the Azorean population, Terceira island. *Infect Agent Cancer.* 2008. 21: 3-6.

Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* 1989. 17: 934–937.

Dyson N. The regulation of E2F by pRb-family proteins. *Genes Dev.* 1998. 12: 2245–2262.

Einstein MH, Schiller JT, Viscidi RP, Strickler HD, Coursaget P, Tan T, Halsey N, Jenkins D. Clinician's guide to human papillomavirus immunology: knowns and unknowns. *Lancet Infect Dis.* 2009. 9 (6): 347-356.

Ellerbrock TV, Chiasson MA, Bush TJ, Sun XW, Sawo D, Brudney K, Wright TC Jr. Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women. *JAMA.* 2000. 283: 1031-1037.

Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA: Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol.* 1997. 71: 2449-2456.

Evans C, Bauer S, Grubert T, Brucker C, Baur S, Heeg K, Wagner H, Lipford GB. HLA-A2-restricted peripheral blood cytolytic T lymphocyte response to HPV type 16 proteins E6 and E7 from patients with neoplastic cervical lesions. *Cancer Immuno Immunother.* 1996. 42: 151-160.

Evans EM, Man S, Evans AS, Borysiewicz LK. Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus- specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res.* 1997. 57: 2943-2950.

Favre M. Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papillomaviruses. *J Virol.* 1975. 15: 1239-47.

Fehrmann F, Klumpp DJ, Laimins LA. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J Virol.* 2003. 77: 2819–2831.

Ferenczy A, Coutlée F, Franco E, Hankins C. Human Papillomavirus and HIV coinfection and the risk of neoplasias of the lower genital tract: a review of recent developments. *CMAJ.* 2003. 169 (5): 431-434.

Foster SA, Demers GW, Etscheid BG, Galloway DA. The ability of human papillomavirus E6 proteins to target p53 for degradation in vivo correlates with their ability to abrogate actinomycin D-induced growth arrest. *J Virol.* 1994. 68: 5698–5705.

Freitas LB, Pereira CC, Checon R, Leite JP, Nascimento JP, Spano LC. Adeno-associated virus and human papillomavirus types in cervical samples of pregnant and non-pregnant women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009; 145 (1), 41-44.

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: 1500-1510.

Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with HPV16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* 1997. 11: 2090–2100.

Gambhira R, Karanam B, Jagu S, Roberts JN, Buck CB, Bossis I, Alphs H, Culp T, Christensen ND, Roden RB. A protective and broadly cross-neutralizing epitope of human papillomavirus L2. *J Virol.* 2007. 81: 13927-13931.

Genther SM, Sterling S, Duensing S, Munger K, Sattler C, Lambert PF. Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle. *J Virol.* 2003. 77: 2832–2842.

Giancotti FG, Stepp MA, Suzuki S, Engvall E, Ruoslahti E: Proteolytic processing of endogenous and recombinant beta 4 integrin subunit. *J Cell Biol.* 1992. 118:951-959.

Gilbert DM, Cohen SN. Bovine papilloma virus plasmids replicate randomly in mouse fibroblasts throughout S phase of the cell cycle. *Cell.* 1987. 50:59-68.

Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M: Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol.* 2001. 75: 1565-1570.

Gravitt PE, Peyton CN, Apple RJ, Wheeler CM. Genotyping of 27 Human Papillomavirus Types by Using L1 Consensus PCR Products by a Single-Hybridization, Reverse Line Blot Detection Method. *J Clin Microbiol.* 1998. 36 (10): 3020-3027.

Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2000. 38 (1): 357-361.

Schiffman M, Wheeler CM, Castle PE. Human papillomavirus DNA remains detectable longer than related cervical cytologic abnormalities. *J Infect Dis.* 2002. 15; 186 (8): 1169-1172.

Grinsztejn B, Veloso VG, Levi JE, Velasque L, Luz PM, Friedman RK, Andrade AC, Moreira RI, Russomano F, Pilotto JH, Bastos FI, Palefsky J. Factors associated with increased prevalence of human papillomavirus infection in a cohort of HIV-infected Brazilian women. *Int J Infect Dis.* 2009. 13 (1): 72-80.

Gross GE, Barrasso R. Infecção por Papilomavírus humano. Atlas clínico de HPV. Porto Alegre: Artmed, 1999.

Gu W, Li M, Zhao WM, Fang NX, Bu S, Frazer IH, Zhao KN. tRNASer(CGA) differentially regulates expression of wild-type and codon-modified papillomavirus L1 genes. *Nucleic Acids Res.* 2004. 32: 4448-4461.

Guimaraes MD. Temporal study in AIDS-associated disease in Brazil, 1980-1999. *Cad Saude Publica.* 2000. 16 (Suppl 1): 21-36.

Gutiérrez-Xicoténcatl L, Plett-Torres T, Madrid-González CL, Madrid-Marina V. Molecular diagnosis of human papillomavirus in the development of cervical cancer. *Salud Publica Mex.* 2009. 51 (Suppl 3): S479-488.

Hankins C, Coutlée F, Lapointe N, Simard P, Tran T, Samson J, Hum L. Prevalence of risk factors associated with human papillomavirus infection in women living with HIV. Canadian Women's HIV Study Group. *CMAJ.* 1999. 160 (2): 185-191.

Havre PA, Yuan J, Hedrick L, Cho KR, Glazer PM. p53 inactivation by HPV16 E6 results in increased mutagenesis in human cells. *Cancer Res.* 1995. 55: 4420–4424.

Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.* 1989. 8: 3905–3910.

Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B, Roteli-Martins CM, et al. Sustained efficacy up to 4-5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet.* 2006. 367: 1247-1255.

Hebner C, Beglin M, Laimins LA. Human papillomavirus E6 proteins mediate resistance to interferon-induced growth arrest through inhibition of p53 acetylation. *J Virol.* 2007. 81: 12740–12747.

Heino P, Zhou J, Lambert PF. Interaction of the papillomavirus transcription/replication factor, E2, and the viral capsid protein, L2. *Virology.* 2000. 276: 304-314.

Hemler ME: Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2003. 19: 397-422.

Herrero R, Castle PE, Schiffman M, Bratti MC, Hildesheim A, Morales J, Alfaro M, Sherman ME, Wacholder S, Chen S, Rodriguez AC, Burk RD. Epidemiologic

profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis.* 2005. 191 (11): 1796-1807.

Hillemanns P, Ellerbrock TV, McPhillips S, Dole P, Alperstein S, Johnson D, Sun XW, Chiasson MA, Wright TC Jr. Prevalence of anal human papillomavirus infection and anal cytologic abnormalities in HIV-seropositive women. *AIDS.* 1996. 10: 1641-1647.

Howley PM, Lowy DR. Papillomaviruses and Their Replication. In: Fields BN, Knipe DM. *Fundamental Virology.* 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

Howley PM, Lowy DR. 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.

Holmgren SC, Patterson NA, Ozbun MA, Lambert PF. The minor capsid protein L2 contributes to two steps in the human papillomavirus type 31 life cycle. *J Virol.* 2005. 79: 3938-3948.

Huang CM. Human papillomavirus and vaccination. *Mayo Clin Proc.* 2008. 83 (6): 701-706.

Huang SZ, Sheng M, Zhao JQ, Qiu XK, Zeng YT, Wang QS, He MX, Zhu JM, Liu WP, Li WW. Detection of sickle cell gene by analysis of amplified DNA sequences. *Yi Chuan Xue Bao.* 1989. 16: 475-482.

Hwang T. Detection and typing of human papillomavirus DNA by PCR using consensus primers in various cervical lesions of Korean women. *J Korean Med Sci.* 1999. 14: 593-599.

Hubber NL, Schiller JT, Lowy DR, Androphy EJ. Bovine papilloma virus-transformed cells contain multiple E2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988. 85 (16): 5864-5868.

ICTV - ICTVdB Management (2009). 00.099. Papillomaviridae. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia

University, New York, USA. Disponível em: <<http://www.ictvdb.org/Ictv/fr-index.htm>> Acesso em: 23 nov 2010.

Illades-Aguiar B, Alarcón-Romero LD, Antonio-Véjar V, Zamudio-López N, Sales-Linares N, Flores-Alfaro E, Fernández-Tilapa G, Vences-Velázquez A, Muñoz-Valle JF, Leyva-Vázquez MA. Prevalence and distribution of human papillomavirus types in cervical cancer, squamous intraepithelial lesions, and with no intraepithelial lesions in women from Southern Mexico. *Gynecol Oncol.* 2010. 117 (2): 291-296.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=tabelaestados.asp&UF=BR>. Acesso em 26 nov de 2010.

Jo H & Kim JW. Implications of HPV infection in uterinecervical cancer. *Cancer Ther.* 2005. 3: 419–434.

Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, Jansen KU, Keller PM: The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem.* 1999. 274: 5810-5822.

Kajiji S, Tamura RN, Quaranta V: A novel integrin (alpha E beta 4) from human epithelial cells suggests a fourth family of integrin adhesion receptors. *EMBO J.* 1989. 8: 673-680.

Kawana K, Yasugi T, Taketani Y. Human papillomavirus vaccines: current issues & future. *Indian J Med Res.* 2009. 130 (3): 341-347.

Kessis TD, Connolly DC, Hedrick L, Cho KR. Expression of HPV16 E6 or E7 increases integration of foreign DNA. *Oncogene.* 1996. 13: 427–431.

Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L, Molijn A, Sastrowijoto S, ter Schegget J, *et al.* Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol.* 1999. 37 (8): 2508-2517.

Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med.* 1997. 102: 3-8.

Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, Chiacchierini LM, Jansen KU. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med.* 2002. 347: 1645-1651.

La Ruche G, You B, Mensah-Ado I, Bergeron C, Montcho C, Ramon R, Touré-Coulibaly K, Welffens-Ekra C, Dabis F, Orth G. Human papillomavirus and human immunodeficiency virus infections: relation with cervical dysplasia-neoplasia in African women. *Int J Cancer.* 1998. 76: 480-486.

La Ruche G, Leroy V, Mensah-Ado I, Ramon R, You B, Bergeron C, Mothebesoane-Anoh S, Touré-Coulibaly K, Dabis F. Shortterm follow up of cervical squamous intraepithelial lesions associated with HIV and human papillomavirus infections in Africa. *Int J STD AIDS.* 1999. 10 (6): 363-368.

Laga M, Icenogle JP, Marselha R, Manoka AT, Nzila N, Ryder RW, Vermund S H, Heyward WL, Nelson A, Reeves WC. Genital papillomavirus infection and cervical dysplasia- opportunistic complications of HIV infection. *Int J Cancer.* 1992. 50: 45-48.

Lai HC, Sun CA, Yu MH, Chen HJ, Liu HS, Chu TY. Favorable clinical outcome of cervical cancers infected with human papilloma virus type 58 and related types. *Int J Cancer.* 1999. 84: 553-537.

Laimins LA. Human papillomaviruses target differentiating epithelium for virion production and malignant conversion. *Semin Virol.* 1996. 7: 305-313.

Lambert PF, Spalholz BA, Howley PM. A transcriptional repressor encoded by BPV-1 shares a common carboxy-terminal domain with the E2 transactivator. *Cell.* 1987. 50: 69-78.

Laniosz V, Holthusen KA, Meneses PI. Bovine papillomavirus type 1: from clathrin to caveolin. *J Virol.* 2008. 82: 6288-6298.

Lee SJ, Cho YS, Cho MC, Shim JH, Lee KA, Ko KK, Choe YK, Park SN, Hoshino T, Kim S, Dinarello CA, Yoon DY. Both E6 and E7 oncoproteins of

human papillomavirus 16 inhibit IL-18-induced IFN-gamma production in human peripheral blood mononuclear and NK cells. *J Immunol.* 2001. 167: 497-504.

Leechanachai P, Banks L, Moreau F, Matlashewski G. The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene.* 1992. 7 (1): 19-25.

Levi EJ, Kleter B, Quint GV, Fink CS, Canto LM, Matsubara R, Linhares I, Segurado A, Vanderborght B, Neto JE, et al. Human papillomavirus prevalence, viral load and cervical intraepithelial neoplasia in HIV-infected women. *Braz J Infect Dis.* 2002. 6: 129-135.

Levi EJ, Kleter B, Quint GV, Fink CS, Canto LM, Matsubara R, Linhares, I.; Segurado, A.; Vanderborght, B.; Neto, J.E.; Doorn, L.J. High prevalence of Human Papilloma virus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. *J. of Clinical. Microbiology.* 2002. 40 (9): 3341-3345.

Levi JE, Fernandez S, Tateno AF, Lima LP, Eluf-Neto J, Pannuti CS. Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. *Gynecol Oncol.* 2004. 92 (1): 225-231.

Levy S, Shoham T: Protein-protein interactions in the tetraspanin web. *Physiology.* Bethesda. 2005. 20: 218-224.

Li X & Coffino P. High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *J Virol.* 1996. 70: 4509–4516.

Lie ES, Heyden A, Johannesen MK, Boysen M, Brandtzaeg P. Detection of human papillomavirus in routinely processed biopsy specimens from laryngeal papillomas: evaluation of reproducibility of polymerase chain reaction and DNA in situ hybridization procedures. *Acta Otolaryngol.* 1996. 116: 627-632.

Lima BMC, Golub JE, Mattos AT, Freitas LB, Spano LC, Miranda AE. Human Papillomavirus in Women With and Without HIV-1 Infection Attending an STI Clinic in Vitoria, Brazil. *J Int Assoc Physicians AIDS Care.* 2009. 8 (5): 286-290.

Lo KW, Cheung TH, Chung TK, Wang VW, Poon JS, Li JC, Lam P, Wong YF. Clinical and prognostic significance of human papillomavirus in a Chinese population of cervical cancers. *Gynecol Obstet Invest.* 2001. 51: 202-207.

Lowy DR, Howley PM. PAPILOMAVIRUS. IN: FIELDS BN, KNIPE DM, HOWLEY PM, et al., eds. *Fields Virology*, ed 4. Philadelphia, Lippincott Williams &Wilkins, CD-rom, 2001.

Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest.* 2006. 116: 1167-1173.

Luchters SM, Vanden BD, Chersich MF, Nel A, Delva W, Mandaliya K, Depuydt CE, Claeys P, Bogers JP, Temmerman M. Association of HIV infection with distribution and viral load of HPV types in Kenya: a survey with 820 female sex workers. *BMC Infect Dis.* 2010. 26: 10-18.

Luque AE, Jabeen M, Messing S, Lane CA, Demeter LM, Rose RC, Reichman RC. Prevalence of human papillomavirus genotypes and relate abnormalities of cervical cytological results among HIV-1-infected women in Rochester, New York. *J Infect Dis.* 2006. 194 (4): 428-434.

Mach H, Volkin DB, Troutman RD, Wang B, Luo Z, Jansen KU, Shi L. Disassembly and reassembly of yeast-derived recombinant human papillomavirus virus-like particles (HPV VLPs). *J Pharm Sci.* 2006. 95: 2195-2206.

Mandelblatt JS, Kanetsky P, Eggert L, Gold K. Is HIV infection a cofactor for cervical squamous cell neoplasia? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999. 8: 97-106.

Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells.* 1989. 7: 209-214.

Mariani L, Venuti A. HPV vaccine: an overview of immune response, clinical protection, and new approaches for the future. *J Transl Med.* 2010. 27; 8 (1): 105-113.

Massimi P, Shai A, Lambert P Banks L. HPV E6 degradation of p53 and PDZ containing substrates in an E6AP null background. *Oncogene*. 2008. 27: 1800–1804.

McKenzie ND, Kobetz EM, Hnatyszyn J, Twiggs LB, Lucci JA. Women with HIV are more commonly infected with non-16 and non-18 high-risk HPV types. *Gynecol Oncol*. 2009. 116 (3): 572-577.

McMillan NA, Payne E, Frazer IH, Evander M: Expression of the alpha6 integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. *Virology*. 1999. 261: 271-279.

Melo A, Roa I, Montenegro S, Capurro I, Roa J. Estudio comparativo de detección del virus papiloma humano (VPH) en muestras citológicas y biopsias de cuello uterino. *Rev Méd Chile*. 2005. 133: 639-644.

Menton JF, Cremin SM, Canier L, Horgan M, Fanning LJ. Molecular epidemiology of sexually transmitted human papillomavirus in a self referred group of women in Ireland. *Virology*. 2009. 6: 112-118.

Meyer T, Arndt R, Christophers E, Beckmann ER, Schröder S, Gissmann L, Stockfleth E. Association of rare human papillomavirus types with genital premalignant and malignant lesions. *J Infect Dis*. 1998. 178: 252-255.

Meyers C, Frattini MG, Hudson JB, Laimins LA. Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation. *Science*. 1992. 14; 257: 971-973.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Inquérito Domiciliar sobre comportamentos de risco e morbidade referida de doenças e agravos não transmissíveis: Brasil, 15 capitais e Distrito Federal 2002-2003. Rio de Janeiro: INCA; 2004.

Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer – INCA; 2007.

Minkoff H, Feldman J, DeHovitz J, Landesman S, Burk R. A longitudinal study of human papillomavirus carriage in human immunodeficiency virus-infected and human immunodeficiency virus-uninfected women. *Am J Obstet Gynecol.* 1998. 178 (5): 982-986.

Minkoff H, Feldman JG, Strickler HD, Watts DH, Bacon MC, Levine A, Palefsky J M, Burk R, Cohen MH, Anastos K. Relationship between smoking and human papillomavirus infections in HIV-infected and -uninfected women. *J Infect Dis.* 2004. 189: 1821-1828.

Mohr IJ, Clark R, Sun S, Androphy EJ, MacPherson P, Botchan MR. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science.* 1990. 250: 1694–1699.

Moscicki AB, Ellenberg JH, Farhat S, Xu J. Persistence of human papillomavirus infection in HIV-infected and -uninfected adolescent girls: risk factors and differences, by phylogenetic type. *J Infect Dis.* 2004. 190: 37-45.

Motti PG, Dallabetta GA, Daniel RW, Canner JK, Chipangwi JD, Liomba GN, Shah KV. Cervical abnormalities, human papillomavirus, and human immunodeficiency virus infections in women in Malawi. *J Infect Dis.* 1996. 173 (3): 714-717.

Mudhakir D, Harashima H: Learning from the viral journey: how to enter cells and how to overcome intracellular barriers to reach the nucleus. *AAPS J.* 2009. 11: 65-77.

Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol.* 2000. 19: 1-5.

Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJ, Bosch FX. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet.* 2002. 359: 1093-1101.

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003. 348:518-527.

Münger K & Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*. 2002. 89: 213–228.

Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh K. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol*. 2004. 78: 11451–11460.

Nakagawa M, Stites DP, Palefsky JM, Kneass Z, Moscicki AB. CD4-positive and CD8-positive cytotoxic T lymphocytes contribute to human papillomavirus type 16 E6 and E7 responses. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999. 6: 494-498.

Nicholls PK, Klaunberg BA, Moore RA, Santos EB, Parry NR, Gough GW, Stanley MA. Naturally occurring, nonregressing canine oral papillomavirus infection: host immunity, virus characterization, and experimental infection. *Virology*. 1999. 265: 365-374.

Norris TG. HIV update. *Radiol Technol*. 2002. 73 (4): 339-363.

Ochi H, Kondo K, Matsumoto K, Oki A, Yasugi T, Furuta R, et al. Neutralizing antibodies against human papillomavirus types 16, 18, 31, 52, and 58 in serum samples from women in Japan with low-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Vaccine Immunol*. 2008. 15: 1536-1540.

Oliveira LHS, Rodrigues EVM, Lopes APTS, Fernandes AP, Cavalcanti SMB. HPV 16 detections in cervical lesions, physical state of viral DNA and changes in p53 gene. *São Paulo Med J*. 2003. 121: 67-71.

Oliveira LHS, Rosa MLG, Cavalcanti SMB. Patterns of genotype distribution in multiple human papillomavirus Infections. *Clin Microbiol Infect*. 2008. 14 (1): 60-65.

Oliveira LH, Ferreira MD, Augusto EF, Melgaço FG, Santos LS, Cavalcanti SM, Rosa ML. Human papillomavirus genotypes in asymptomatic young women

from public schools in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010. 43 (1): 4-8.

Oliveira LHS, Rosa MLG, Pereira CRN, Vasconcelos GALBM, Silva RA, Barrese TZ, Carvalho MO, Abi GM, Rodrigues EM, Cavalcanti SMB. Human Papillomavirus status and cervical abnormalities in women from public and private health care in Rio de Janeiro state, Brazil. *Rev Inst Med trop S Paulo.* 2006. 48 (5): 279-285.

Oriel JD. Natural history of genital warts. *Br J Vener Dis.* 1971. 47: 1-13.

Organização Mundial de Saúde- HPV LabNet. Human Papillomavirus Laboratory Manual. First Edition, 2009.

Paesi S, Serafini EP, Barea F, Madi SRC, Echeverrigaray S. High Prevalence of Human Papillomavirus Type 58 in Patients With Cervical Pre-malignant Lesions in Southern Brazil. *J Med Virol.* 2009. 81 (7): 1270-1275.

Palefsky JM, Minkoff H, Kalish LA, Levine A, Garcia P, Melnick S, Miotti P, Burk R. Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. *J Natl Cancer Inst.* 1999. 91: 226-236.

Park JS, Kim EJ, Lee JY, Sin HS, Namkoong SE, Um SJ. Functional inactivation of p73, a homolog of p53 tumor suppressor protein, by human papillomavirus E6 proteins. *Int J Cancer.* 2001. 91: 822-827.

Paavonen J, Naud P, Salmerón J, Wheeler CM, Chow SN, Apter D, Kitchener H, Castellsague X, Teixeira JC, Skinner SR, Hedrick J, Jaisamrarn U, Limson G, Garland S, Szarewski A, Romanowski B, Aoki FY, Schwarz TF, Poppe WA, Bosch FX, Jenkins D, Hardt K, Zahaf T, Descamps D, Struyf F, Lehtinen M, Dubin G; HPV PATRICIA Study Group, Greenacre M. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet.* 2009. 25; 374 (9686): 301-314

Pinto AP, Baggio HCC, Guedes GB. Sexually-Transmitted Viral Diseases in Women: Clinical and Epidemiological Aspects and Advances in Laboratory Diagnosis. *Braz J Infec Dis.* 2005. 9: 241-250.

Qu W, Jiang G, Cruz Y, Chang CJ, Ho GY, Klein RS, Burk RD. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin Microbiol.* 1997. 35: 1304-1310

Queiroz C, Travassos AG, Studart E, Filho JBA, 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. (5): 356-362.

Quint WG, Scholte G, van Doorn LJ, Kleter B, Smits PH, Lindeman J. Comparative analysis of human papillomavirus infections in cervical scrapes and biopsy specimens by general SPF (10) PCR and HPV genotyping. *J Pathol.* 2001. 194: 51-58.

Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP, Amaral RG, Magalhães AV. Human Papillomavirus Prevalence among Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia III and Invasive Cervical Cancer from Goiânia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003. 98 (2): 181-184.

Rabkin CS, Biggar RJ, Baptiste MS, Abe T, Kohler BA, Nasca PC. Cancer incidence trends in women at high risk of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Int J Cancer.* 1993. 55: 208-212.

Ragin CCR, Wheeler VW, Wilson JB, Bunker CH, Gollin SM, Patrik AL, Taioli E. Distinct distribution of HPV types among cancer-free Afro-Caribbean women from Tobago. *Biomarkers.* 2007. 12 (5): 510-522.

Richards RM, Lowy DR, Schiller JT, DayPM. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006. 103:1522–1527.

Roberts S, Ashmole I, Johnson GD, Kreider JW, Gallimore PH. Cutaneous and mucosal human papillomavirus E4 proteins form intermediate filament-like structures in epithelial cells. *Virology.* 1993. 197: 176–187.

Roberts JN, Buck CB, Thompson CD, Kines R, Bernardo M, Choyke PL, Lowy DR, Schiller JT. Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. *Nat Med.* 2007. 13: 857-861.

Roden RB, Kirnbauer R, Jenson AB, Lowy DR, Schiller JT. Interaction of papillomaviruses with the cell surface. *J Virol.* 1994. 68:7260-7266.

Sabol I, Salakova M, Smahelova J, Pawlita M, Schmitt M, Gasperov NM, *et al.* Evaluation of different techniques for identification of human papillomavirus types of low prevalence. *J Clin Microbiol.* 2008. 46 (5): 1606-1613.

Said HM, Ahmed K, Burnett R, Allan BR, Williamson AL, Hoosen AA. HPV genotypes in women with squamous intraepithelial lesions and normal cervixes participating in a community-based microbicide study in Pretoria, South Africa. *J Clin Virol.* 2009. 44 (4): 318-321.

Sandri MT, Lentati P, Benini E, Orto P, Zorzino L, Carozzi FM, Maisonneuve P, Passerini R, Salvatici M, Casadio C, Boveri S, Sideris M. Comparison of the Digene HC2 Assay and the Roche AMPLICOR Human Papillomavirus (HPV) Test for Detection of High-Risk HPV Genotypes in Cervical Samples. *J Clin Microbiol.* 2006. 44 (6): 2141-2146.

Sapp M, Bienkowska-Haba M. Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *FEBS J.* 2009. 276 (24): 7206-7216.

Schaeffer AJ, Nguyen M, Liem A, Lee D, Montagna C, Lambert PF, Ried T, Dippantonio MJ. E6 and E7 oncoproteins induce distinct patterns of chromosomal aneuploidy in skin tumors from transgenic mice. *Cancer Res.* 2004. 64: 538–546.

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 1990. 63: 1129–1136.

Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitinprotein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*. 1993. 75: 495–505.

Selinka HC, Florin L, Patel HD, Freitag K, Schmidtke M, Makarov VA, Sapp M. Inhibition of transfer to secondary receptors by heparan sulfate-binding drug or antibody induces noninfectious uptake of human papillomavirus. *J Virol*. 2007. 81: 10970–10980.

Sieczkarski SB, Whittaker GR: Dissecting virus entry via endocytosis. *J Gen Virol*. 2002. 83: 1535-1545.

Silva KC, Rosa ML, Moyses N, Afonso LA, Oliveira LH, Cavalcanti SM. Risk factors associated with human papillomavirus infection in two populations from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009. 104 (6): 885-891.

Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007. 121 (3): 621-632.

Smith JL, Campos SK, Ozbun MA: Human papillomavirus type 31 uses a caveolin 1- and dynamin 2-mediated entry pathway for infection of human keratinocytes. *J Virol* 2007, 81:9922-9931, Laniosz V, Holthusen KA, Meneses PI: Bovine papillomavirus type 1: from clathrin to caveolin. *J Virol*. 2008. 82: 6288-6298.

Spoden G, Freitag K, Husmann M, Boller K, Sapp M, Lambert C, Florin L. Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16–involvement of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs). *PLoS One*. 2008. 3: 3313.

Stanley MA, Scarpini C, Coleman N. Cell mediated immunity and lower genital tract neoplasia. RCOG monograph; 2003.

Stanley MA. Immune responses to human papilloma viruses. *Indian J Med Res*. 2009. 130 (3): 266-276.

Stern Y, Filipovich A, Cotton RT, Segal K. Immunocompetency in children with recurrent respiratory papillomatosis: prospective study. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2007. 116: 169-171.

Stevens MP, Garland SM, Tan JH, Quinn MA, Petersen RW, Tabrizi SN. HPV genotype prevalence in women with abnormal pap smears in Melbourne, Australia. *J Med Virol.* 2009. 81 (7): 1283-1291.

Straight SW, Hinkle PM, Jewers RJ, McCance DJ. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J Virol.* 1993. 67 (8): 4521-4532.

Strickler HD, Viscidi R, Escoffery C, Rattray C, Kotloff KL, Goldberg J, Manns A, Rabkin C, Daniel R, Hanchard B, et al. Adeno-associated virus and development of cervical neoplasia. *J. Med. Virol.* 1999. 59: 60-65.

Stubenrauch F, Laimins LA. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Sem Cancer Biol.* 1999. 9: 379-386.

Stubenrauch F, Hummel M, Iftner T, Laimins LA. The E8E2C protein, a negative regulator of viral transcription and replication, is required for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes. *J Virol.* 2000. 74: 1178–1186.

Stubenrauch F, Zobel T, Iftner T. The E8 domain confers a novel long-distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high-risk human papillomavirus type 31. *J Virol.* 2001. 75: 4139–4149.

Sun XW, Ellerbrock TV, Lungu O, Chiasson MA, Bush TJ, Wright TC Jr. Human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-seropositive women. *Obstet Gynecol.* 1995. 85: 680-686.

Sun X W, Kuhn L, Ellerbrock T V, Chiasson M A, Bush T J, Wright T C Jr. Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med.* 1997. 337: 1343-1349.

Syrjänen KJ, Syrjänen SM. Papillomavirus infections in human pathology. New York. John Wiley & Sons LTD, 2000.

Talis AL, Huibregtse JM, Howley PM. The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells. *J Biol Chem.* 1998. 273: 6439–6445.

Tanzi E, Amendola A, Bianchi S, Fasolo MM, Beretta R, Pariani E, Zappa A, Frati E, Orlando G. Human papillomavirus genotypes and phylogenetic analysis of HPV-16 variants in HIV-1 infected subjects in Italy. *Vaccine.* 2009. 27 Suppl 1: A17-23.

The oral cancer foundation. Disponível em: <<http://www.oralcancerfoundation.org/facts/images/hpvirus.jpg>>. Acesso em: 12 jul. 2010.

Thomas JT & Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 independently abrogate the mitotic spindle checkpoint. *J Virol.* 1998. 72: 1131–1137.

Thompson DA, Belinsky G, Chang TH, Jones DL, Schlegel R, Munger K. The human papillomavirus-16 E6 oncoprotein decreases the vigilance of mitotic checkpoints. *Oncogene.* 1997. 15: 3025–3035.

Thorner LK, Lim DA, Botchan MR. DNA-binding domain of bovine papillomavirus type 1 E1 helicase: structural and functional aspects. *J Virol.* 1993. 67: 6000-6014.

Tommasino M, Accardi R, Caldeira S, Dong W, Malanchi I, Smet A, Zehbe I. The role of TP53 in cervical carcinogenesis. *Hum Mutat.* 2003. 21: 307-312.

Tozetti IA, Scapulatempo IDL, Kawski VL, Ferreira AW, Levi JE. Multiple Types of Human Papillomavirus in Cervical Samples in Women in Campo Grande, MS, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2006. 10 (5): 309-310.

Trottier H, Mahmud S, Costa MC, Sobrinho JP, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, Franco EL. Human Papillomavirus Infections with Multiple

Types and Risk of Cervical Neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006. 15 (7): 1274-1280.

van den Brule AJ, Pol R, Fransen-Daalmeijer N, Schouls LM, Meijer CJ, Snijders PJ. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol.* 2002. 40 (3): 779-787.

Villa LL. Prophylactic HPV vaccines: reducing the burden of HPV-related diseases. *Vaccine.* 2006. 30; 24 Suppl 1:S23-28.

Villa LL, Ault KA, Giuliano AR, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Brown DR, Ferenczy A, Harper DM, Koutsky LA, Kurman RJ, Lehtinen M, Malm C, Olsson SE, Ronnett BM, Skjeldestad FE, Steinwall M, Stoler MH, Wheeler CM, Taddeo FJ, Yu J, Lupinacci L, Railkar R, Marchese R, Esser MT, Bryan J, Jansen KU, Sings HL, Tamms GM, Saah AJ, Barr E. Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus Types 6, 11, 16, and 18. *Vaccine.* 2006. 24 (27-28): 5571-5583.

Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Paavonen J, Iversen OE, et al. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *Br J Cancer.* 2006. 95: 1459-1466.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999. 189 (1): 12-19.

Watt A, Garwood D, Jackson M, Younger N, Ragin C, Smikle M, Fletcher H, McFalane-Anderson N. High-risk and multiple human papillomavirus (HPV) infectious in cancer-free jamaican women. *Infect Agent Cancer.* 2009. 4 Suppl 1, S11.

Welters MJ, de Jong A, van den Eeden SJ, van der Hulst JM, Kwappenberg KM, Hassane S, Franken KL, Drijfhout JW, Fleuren GJ, Kenter G, Melief CJ, Offringa R, van der Burg SH. Frequent display of human papillomavirus type 16

E6-specific memory t-Helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter. *Cancer Res.* 2003. 63: 636-641.

Welters MJP, van der Logt P, van den Eeden SJF, Kwappenberg KMC, Drijfhout JW, Fleuren GJ, et al. Detection of human papillomavirus type 18 E6 and E7-specific CD4+ T-helper 1 immunity in relation to health versus disease. *Int J Cancer.* 2006. 118: 950-956.

Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science.* 1990. 248: 76–79.

Wideroff L, Schiffman MH, Nonnenmacher B, Hubbert N, Kimbauer R, Greer CE, Lowy D, Lorincz AT, Manos MM, Glass AG, et al. Evaluation of seroreactivity to human papillomavirus type 16 virus-like particles in a incident case-control study of cervical neoplasia. *J Infect Dis.* 1995. 172: 1425-1430.

Wilson R, Fehrmann F, Laimins LA. Role of the E1--E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol.* 2005. 79 (11): 6732-6740.

World Health Organization. *Human Papillomavirus and HPV Vaccines: Technical Information for Policy-makers and Health Professionals.* Geneva: WHO; 2007.

Yoon CS, Kim KD, Park SN, Cheong SW: alpha(6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001. 283: 668-673.

Zanier K, Charbonnier S, Baltzinger M, Nominé Y, Altschuh D, Travé G. Kinetic analysis of the interactions of human papillomavirus E6 oncoproteins with the ubiquitin ligase E6AP using surface plasmon resonance. *J Mol Biol.* 2005. 349: 401–412.

Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Manhardt B, Tindle R, Botz JW, Jansen-Durr P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16, E7 oncoprotein. *Oncogene.* 1996. 13: 2323–2330.

Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* 2006. 11: 2286-2302.

Zhou J, Stenzel DJ, Sun XY, Frazer IH. Synthesis and assembly of infectious bovine papillomavirus particles in vitro. *J Gen Virol.* 1993. 74: 763-768.

zur Hausen H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology.* 1991. 184: 9-13.

zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002. 2: 342-350.

ANEXO 1

APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO BIOMÉDICO

Vitória-ES, 29 de setembro de 2005

Do: Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico

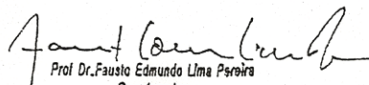
Para: Profa. Dra. Angélica Espinosa Barbosa Miranda
Pesquisadora Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado: "Prevalência de infecção pelo papilomavírus, distribuição de genótipos e neoplasia intra-epitelial cervical em mulheres infectadas pelo HIV"

Senhora Pesquisadora,

Através deste informo à V.Sa., que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar o Projeto de Pesquisa intitulado: "Prevalência de infecção pelo papilomavírus, distribuição de genótipos e neoplasia intra-epitelial cervical em mulheres infectadas pelo HIV", bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, APROVOU o referido projeto, em reunião ordinária realizada em 28 de setembro de 2005.

Gostaríamos de lembrar que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/96, inciso IX.2. letra "c".

Atenciosamente,


Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa
Centro Biomédico UFES

ANEXO 2

CÓPIA DO EMAIL COM RESPOSTA DE ACEITE

Dr.Adriana:

We have now completed the review of your submission "BJM-2294 - Diversity and uncommon HPV types in HIV seropositive and seronegative women attendingan STI Clinic and seronegative women attending a STI Clinic." Our decision is to accept

Additional comments on the paper, based on the editorial and peer review, are found by logging in to the journal web site:

Submission URL:

<http://submission.scielo.br/index.php/bjm/author/submission/35083>

Username: adrianatonani

If you have any questions, please contact me.

Brazilian Journal of Microbiology

Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira

Associate editor

Brazilian Journal of Microbiology

MANUSCRITO SUBMETIDO

Diversity and uncommon HPV types in HIV seropositive and seronegative women attending an STI clinic

Adriana Tonani de Mattos¹, Luciana Bueno de Freitas¹, Bettina Moulin Coelho Lima², Angélica Espinosa Miranda¹ and Liliana Cruz Spano^{1, 2,*}

¹Núcleo de Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo

²Centro de Referência de DST/AIDS, Prefeitura Municipal de Saúde

³Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos 1468, Maruípe, 29040-091, Vitória, ES, Brazil

*Corresponding author: lspano.vix@terra.com.br. Phone/Fax: 55 27 3335.7297

/ 55 27 3335.7290

ABSTRACT

Given the causal relationship between specific types of HPV with cervical cancer and precursor lesions, it is important to identify the viral type involved. The aim of this study is to assess the prevalence of HPV types in HIV seropositive and seronegative women. Accordingly, 77 HPV positive cervical samples were obtained from 284 women (seropositive (n=112) and seronegative (n=172) for HIV) who attended a Sexually Transmitted Infection clinic, in Vitoria, Southeastern Brazil. Viral DNA was amplified by PCR using MY09/MY11 degenerated primers and the genotyping was performed by Restriction Fragment Length Polymorphism. Seventy five out of the 77 HPV samples were genotyped: 6, 11, 13, 16, 18, 26, 31, 31b, 32, 33, 34, 35, 52, 53, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 71, 81, 83, 84. The most prevalent type was HPV16 followed by HPV types 6, 11 and 53. Fifty five percent and 45% belonged to high and low risk types, respectively. High risk types corresponded to 59% and 54.5% of the HPV detected in HIV seronegative and seropositive women, respectively. The uncommon HPV 13 type in cervical samples was also observed in this study. The oncogenic types were more common in the HIV seronegative samples and the number of cases with multiple infections was similar for the two groups. HPV typing is not only important clinically for the establishment of monitoring and treatment of a patient, it also provides knowledge of the viral types circulating in a population, which is of interest in the development of prevention and treatment programs for this disease.

Key words

Human papillomavirus (HPV); HIV seropositive and seronegative women; RFLP; genotyping; cervical secretion

INTRODUCTION

Human papillomavirus (HPV) are major sexually transmitted infectious agents (2) and they are the second most common cause of cancer death among women; they are associated with cervical cancer in 99.7% of cases (28).

HPVs are classified into more than 100 types (33), nearly 40 of them cause anogenital infection (56) and they are divided into low risk (LR) or high risk (HR) according to their association with cervical cancer (29).

HPV infection is particularly burdensome for HIV-infected women as it is more difficult for them to eliminate the virus, which increases the risk of developing cervical dysplasia and cancer (1, 11, 18, 34). Moreover, recent studies indicate a higher frequency of high risk types and a more persistent infection in HIV positive women, in opposition to low risk types found in HIV negative women, other than cases of co-infection (14, 25).

So, the aim of the present study is to determine the frequency of HPV types in HIV seropositive and seronegative women.

MATERIAL AND METHODS

Cases and Samples

This is a descriptive study using 284 cervical brush samples obtained from HIV seropositive (n=112) and seronegative (n=172) women, from 14 to 51 years old (median 29 years old), attending a Sexually Transmitted Infection and AIDS (STI/AIDS) clinic in Vitoria, Brazil, in the period from March to December of

2006 (44). Participants were interviewed after providing informed consent. Enrolled participants underwent a gynecological evaluation and cervical scrape samples were collected for cytological analysis and HPV DNA polymerase chain reaction (PCR) as previously described by our group (27). Seventy seven HPV positive samples were genotyped in this study. From these, 43% (33/77) were from HIV seropositive women and 57% (44/77) from HIV seronegative. Five out of the 77 samples were from women with cytological abnormalities; two and three of them from HIV seropositive and seronegative women, respectively. Seventy two samples were from women with normal cytology or benign cellular changes: three with low grade squamous intraepithelial lesions (SIL), one high grade SIL and one atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS).

DNA extraction and polymerase chain reaction for HPV

Viral DNA was extracted from the samples by the QIAamp DNA Mini Kit TM (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions or by the isothiocyanate guanidine and silica methodology (7). HPV DNA amplification was carried out in a final volume of 100 μ L, containing 2.5 U of Taq DNA polymerase enzyme (Invitrogen, Brazil), 40 pmol of each consensus primer MY09/11, 2.5 μ L of reaction buffer 10X (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl), 1.5 mM of MgCl₂, and 200 μ M of each dNTP (2, 32), following a amplification program previously described (38). β -globin gene amplification was used as control for the extraction and DNA integrity.

The reactions were carried out in a Perkin Elmer CETUS Thermo Cycler and the amplicons, stained with 0.5 mg/mL ethidium bromide after electrophoresis on 1.5% agarose gel, were observed by a gel imaging system (Bio-Imaging

Systems™). All precautions to avoid cross contamination and PCR inhibition were observed. Water was included for all extraction and amplification procedures as a negative control.

HPV genotyping by Restriction Fragment Length Polymorphism

HPV genotyping was carried out using the RFLP methodology, which is able to detect 44 HPV genital types, as described by Bernard et al. (4). Accordingly, the product of MY09/11 amplification, quantified by spectrophotometer NanoDrop™ (NanoDrop Technologies), was digested overnight in a separate reaction containing twenty units of each digestion enzyme *BamH I*, *Dde I*, *Hae III*, *Hinf I*, *Pst I*, *RsaI* and *Sau3A I* (Promega, Madison, WI, USA). The fragments were revealed by electrophoresis on 3% agarose gel stained by ethidium bromide, as mentioned before, or on acrylamide gel stained by silver nitrate, and compared with the fragments described by Bernard et al., (4) for analyses of the HPV type.

ETHICS

All experiments were performed in compliance with relevant laws and institutional guidelines and in accordance with ethical standards. The researchers obtained approval for the study from the Ethical Research Committee of the Health Science Center of the Federal University of Espírito Santo. All the women gave their free and informed consent.

RESULTS

To determine the HPV infectious type, the HPV DNA of all samples was amplified by PCR. The RFLP technique genotyped 75 out of the 77 samples, the two remaining samples showed indeterminate types. Twenty six different types were found, among them the most prevalent were types 16 (20%), followed by types 6 (12%), 11 and 53 (10.6%) (Figure 1).

In HIV positive women 18 different HPV types were detected, the most prevalent types were 16 (18.2%), 6, 11 and 31 (12% each), while in HIV negative women 19 different types were found; and the most frequent were HPV16 (20.5%), 6 and 53 (11.4% each). Among the HPV types determined, 55% (n=44) were high risk and 45% (n=36) were low risk types, including the types found in co-infection cases. High-risk HPV types were present in low SIL, high SIL and ASCUS out of the five cases with cytological abnormalities (Table 1).

HIV seronegative women showed 59% of high risk types (26/44) and HIV seropositive women 54.5% (18/33). HPV types were not determined in two cases, both in HIV negative women. Thirteen cases of multiple infections were observed, seven of them occurred among HIV positive women. Out of the total, ten cases had two HPV types and three, three distinct HPV types. The genotypes observed in co-infection were: 6, 11, 13, 16, 26, 31, 33, 52, 53, 55, 56, 61, 62, 71 and 81.

DISCUSSION

It is of great importance to establish the types of HPV circulating in different regions especially in order to be able to follow up the effectiveness of the quadrivalent and bivalent vaccines commercially available (20, 54). There are few studies concerning HPV types in the Espírito Santo region, and the studies that have been carried out employed a low number of samples (17) or used a PCR with specific primers targeting only seven distinct types (27). In contrast this study used a larger number of samples were used in this study and the RFLP technique, which is able to detect 44 types of HPV that infect mucosa, was used. The results obtained in this study revealed that 76% of the women would not be protected by the quadrivalent vaccine and 84% of them would not be protected by the bivalent vaccine, unless cross-protection with the closest phylogenetical HPV-type occurred. The cross-protection was described for HPV31 and HPV45, which are types related to HPV16 and HPV 18 (6). However, studies concerning cross protection are limited by the time and amplitude of vaccine usage compromising conclusions in this matter.

This study also describes a higher prevalence of the HPV16 type (16%). Although different types of HPV show a variable geographic distribution (12), HPV16 is usually indicated as the most prevalent type in South America, Asia and Europe in general, as in Brazil (8, 9, 12, 39, 41, 43, 44, 52, 53). In Sub-Saharan Africa HPV16 was the second most prevalent (12) and in several other studies showed varied prevalence, but it is usually high (15, 25, 35, 46, 55, 47).

Studies had shown that HIV seropositive women are normally infected by high risk HPV types different from 16 and 18 (47, 23, 25, 26, 31). However, the

present study demonstrated HPV16 as the most prevalent type among both HIV positive and HIV negative women, which may be due to a regional distribution feature of this HPV type. Moreover, other studies such as Tanzi et al. (51) identified HPV 16 in HIV positive women as the most prevalent type among those with and without cytological alterations. The higher prevalence of HPV16 in HIV negative women has already been described, and this type accounts for 55% of cervical cancer cases in the world (48).

Since HIV infected women are susceptible to opportunistic infections, it is not surprising that HPV types are more prevalent in HIV-positive women (34). Also the vast majority of studies show that individuals infected with HIV have a higher prevalence of high-risk HPVs (24, 37, 51). Minkoff et al. (36) reported a level of oncogenic types three times higher in HIV-positive women. However in the present study similar levels of HPV types were found in both populations, although slightly higher among HIV-negative women (59% vs. 54.5%).

In HIV-infected women there is an increased risk of HPV infection and squamous intraepithelial lesions (SIL), the precursor of cervical cancer (45, 50). In this study, SIL cases were similar in HIV seropositive and seronegative women, a fact also observed by Luchters et al. in 2010 (30). Moreover the cases of abnormalities were infected by only one HPV type, a not uncommon fact. Fernandes et al., 2008 (16) reported single infection in more than a half of the cases with abnormalities. Samples from women with cervical lesions were infected similarly with high risk and low risk HPV types. It is interesting that many cases of normal cytology were infected by high risk HPV types. These women have a greater chance of developing persistent infection, which can remain asymptomatic for an undetermined period.

The most prevalent types after HPV16 were 6 (9.7%), 11 and 53 (8.6%), which are normally present in Brazilian studies (8, 9, 19, 25, 39, 41, 43, 44, 52), but less frequent in other countries like South Africa, Jamaica, Australia and Ireland (35, 55, 47, 49).

The rate of undetermined types found in this study was low (2.2%), which is due to the RFLP technique used that is able to identify 44 of the 50 types of HPV that infect the mucosa. Other studies using the same methodology found rates of 4.3% to 36.4% of undetermined types (17, 40, 41), while the percentage of these undetermined types varied from 4.2% to 45.1% with the following techniques: AMPLICOR associated to Linear Array, Dot Blot, Linear Array, *Kit Papillomavirus Clinical Arrays*®, PCR with specific primers (15, 21, 27, 46, 55).

Unexpectedly, in this study HPV13 was found in 4.3% of the samples. This is a rare low risk type, related to HPV6 (13, 21), well-known to be associated with focal epithelial hyperplasia (3) and unusually found in studies infecting the genital tract. Illades-Aguiar et al. (22) found this type in 0.1% of low grade squamous intraepithelial lesion samples, in Mexico. These low percentages of HPV13 could be partially explained by the fact that various techniques of genotyping of HPV are not able to determine this type or due to the uncommon distribution of this type. Unfortunately, the cervical secretions in our study were not enough to sequence those samples to confirm the presence of this HPV type.

HPV type 32 was found in 1% of the samples in the present study and, similar to HPV13, is a major cause of focal hyperplasia epithelial (3). On the other

hand, this type is more commonly found infecting the genital tract (10, 21, 22, 42), including in the region of this study (17).

The present study showed a similar number of co-infection cases in HIV-positive and HIV-negative women (7 versus 6) and the maximum number of types found was three. In contrast Levi et al. (25) demonstrated in their study 78.9% of multiple infections with up to 10 different types of HPV in HIV-positive women. Other studies show similarly large number of multiple infections in HIV-positive women (14, 51).

Further studies are extremely important to establish the HPV type in different regions, not only for following up the effectiveness of vaccines released for sale, but also to determine the best prognosis and monitoring of these women, as well as defining specific health policies for the female population infected with HIV.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (FACITEC) and Fundação de Apoio à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) for their financial aid.

REFERENCES

- 1- Adachi, A.; Fleming, I.; Burk, R.D.; Ho, G.Y.; Klein, R.S. (1993). Women with human immunodeficiency virus infection and abnormal Papanicolaou smears: a prospective study of colposcopy and clinical outcome. *Obstet. Gynecol.* 81(3), 372-377
- 2- Bauer, H.M.; Ting, Y.; Greer, C.E.; Chambers, J.C.; Tashiro, C.J.(1991). Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA.* 265 (4), 472-477.
- 3- Beaudenon, S.; Praetorius, F.; Kremsdorf, D.; Lutzner, M.; Worsaae, N.; Pehau-Arnaudet, G.; Orth, G. (1987). A new type of human papillomavirus associated with oral focal epithelial hyperplasia. *J. Invest. Dermatol.* 88 (2), 130-135.
- 4- Bernard, H.U.; Chan, S.Y.; Manos, M.M.; Ong, C.; Villa L.L.; Delius, H.; Peyton, C.L.; Bauer, H.M.; Wheeler, C.M. (1994). 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.* 170 (5), 1077-1085.
- 5- Blossom, D.B.; Beigi, R.H.; Farrell, J.J.; Mackay, W.; Qadadri, B.; Brown, D.R.; Rwambuya, S.; Walker, C.J.; Kambugu, F.S.; Abdul-Karim, F.W.; Whalen, C.C.; Salata, R.A. (2007). Human papillomavirus genotypes associated with cervical cytologic abnormalities and HIV infection in Ugandan women. *J. Med. Virol.* 79 (6), 758-765.
- 6- Bonanni, P.; Boccalini, S.; Bechini, A. (2009). Efficacy, duration of immunity and cross protection after HPV vaccination: a review of the evidence. *Vaccine.* 27 Suppl 1, A46-53.
- 7- Boom, R.; Sol, C.; Salimans, M.M.; Jansen, C.L.; Wertheim-Van Dillen, P.M.; Van Der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28 (3), 495-503.

8- Camara, G.N.L.; Cerqueira, D.M.; Oliveira, A.P.G.; Silva, E.O.; Carvalho, L.G.S.; Martins, C.R.F. (2003). Prevalence of Human Papillomavirus Types in Women with Pre-neoplastic and Neoplastic Cervical Lesions in the Federal District of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98 (7), 879-883.

9- Campos, E.A.; Simões, J.A.; Rabelo-Santos, S.H.; Sarian, L.O.; Pitta, D.R.; Levi, J.E.; Derchain, S. (2008). Recovery of DNA for the detection and genotyping of human papillomavirus from clinical cervical specimens stored for up to 2 years in a universal collection medium with denaturing reagent. *J. Virol. Methods.* 147 (2), 333-337

10- Cerqueira, D.M.; de S Moraes, D.; Camara, G.N.; Amaral, F.A.; Oyama, C.N.; dos Santos, M.Q.; Martins, C.R. (2007). High HPV genetic diversity in women infected with HIV-1 in Brazil. *Arch. Virol.* 152 (1), 75-83.

11- Chiasson, M.A.; Ellerbrock, T.V.; Bush, T.J.; Sun, X.W.; Wright, Jr T.C. (1997). Increased prevalence of vulvovaginal condyloma and vulvar intraepithelial neoplasia in women infected with the human immunodeficiency virus. *Obstet. Gynecol.* 89 (5 Pt 1), 690-694.

12- Clifford, G.M.; Gallus, S.; Herrero, R.; Muñoz, N.; Snijders, P.J.; Vaccarella, S.; Anh, P.T.; Ferreccio, C.; Hieu, N.T.; Matos, E.; Molano, M.; Rajkumar, R.; Ronco, G.; de Sanjosé, S.; Shin, H.R.; Sukvirach, S.; Thomas, J.O.; Tunsakul, S.; Meijer, C.J.; Franceschi, S.; IARC HPV Prevalence Surveys Study Group (2005). Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet.* 366 (9490), 991-998.

13- de Villiers, E.M.; Fauquet, C.; Broker, T.R.; Bernard, H.U.; zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology.* 324 (1), 17-27.

14- Desruisseau, A.J.; Schmidt-Grimminger, D.; Welty, E. (2009). Epidemiology of HPV in HIV-positive and HIV-negative fertile women in Cameroon, West Africa. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 810596, 1-6.

15- Dutra, I.; Santos, M.R.; Soares, M.; Couto, A.R.; Bruges-Armas, M.; Teixeira, F.; Monjardino, L.; Hodgson, S.; Bruges-Armas, J. (2008).

Characterization of human papillomavirus (HPV) genotypes in the Azorean population, Terceira island. *Infect. Agent. Cancer.* 21, 3-6.

16- Fernandes, T.A.A.M.; Meissner, R.V.; Bezerra, L.F.; Azevedo, P.R.M.; Fernandes, J.V (2008). Human Papillomavirus infection in women attended at a cervical cancer screening service in Natal, Brazil. *BJM.* 39, 573-578.

17- Freitas, L.B.; Pereira, C.C.; Checon, R.; Leite, J.P.; Nascimento, J.P.; Spano, L.C. (2009). Adeno-associated virus and human papillomavirus types in cervical samples of pregnant and non-pregnant women. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 145 (1), 41-44.

18- Frutcher, R.G.; Maiman, M.; Arrastia, C.D.; Matthews, R.; Gates, E.J.; Holcomb, K. (1998). Is HIV infection a risk factor for advanced cervical cancer? *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 18 (3), 241-245.

19- Grinsztejn, B.; Veloso, V.G.; Levi, J.E.; Velasque, L.; Luz, P.M.; Friedman, R.K.; Andrade, A.C.; Moreira, R.I.; Russomano, F.; Pilotto, J.H.; Bastos, F.I.; Palefsky, J. (2009). Factors associated with increased prevalence of human papillomavirus infection in a cohort of HIV-infected Brazilian women. *Int. J. Infect. Dis.* 13 (1), 72-80.

20- Harper, D.M.; Franco, E.L.; Wheeler, C.M.; Moscicki, A.B.; Romanowski, B.; Roteli-Martins, C.M.; Jenkins, D.; Schuind, A.; Costa Clemens, S.A.; Dubin, G.; HPV Vaccine Study group (2006). Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet.* 367 (9518), 1247-1255.

21- Herrero, R.; Castle, P.E.; Schiffman, M.; Bratti, M.C.; Hildesheim, A.; Morales, J.; Alfaro, M.; Sherman, M.E.; Wacholder, S.; Chen, S.; Rodriguez, A.C.; Burk, R.D. (2005). Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J. Infect. Dis.* 191 (11), 1796-1807.

22- Illades-Aguiar, B.; Alarcón-Romero, L.D.; Antonio-Véjar, V.; Zamudio-López, N.; Sales-Linares, N.; Flores-Alfaro, E.; Fernández-Tilapa, G.; Vences-

Velázquez, A.; Muñoz-Valle, J.F.; Leyva-Vázquez, M.A. (2010). Prevalence and distribution of human papillomavirus types in cervical cancer, squamous intraepithelial lesions, and with no intraepithelial lesions in women from Southern Mexico. *Gynecol. Oncol.* 117 (2), 291-296.

23- La Ruche, G.; You, B.; Mensah-Ado, I.; Bergeron, C.; Montcho, C.; Ramon, R.; Touré-Coulibaly, K.; Welffens-Ekra, C.; Dabis, F.; Orth, G. (1998). Human papillomavirus and human immunodeficiency virus infections: relation with cervical dysplasia-neoplasia in African women. *Int. J. Cancer.* 76 (4), 480-486.

24- La Ruche, G.; Leroy, V.; Mensah-Ado, I.; Ramon, R.; You, B.; Bergeron, C.; Mothebesoane-Anoh, S.; Touré-Coulibaly, K.; Dabis, F. (1999). Shortterm follow up of cervical squamous intraepithelial lesions associated with HIV and human papillomavirus infections in Africa. *Int. J. STD AIDS.* 10 (6), 363-368.

25- Levi, E.J.; Kleter, B.; Quint, G.V.; Fink, C.S.; Canto, L.M.; Matsubara, R.; Linhares, I.; Segurado, A.; Vanderborght, B.; Neto, J.E.; Doorn, L.J. (2002). High prevalence of Human Papilloma vírus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. *J. of Clinical. Microbiology.* 40 (9), 3341-3345.

26- Levi, J.E.; Fernandez, S.; Tatenno, A.F.; Lima, L.P.; Eluf-Neto, J.; Pannuti, C.S. (2004). Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. *Gynecol. Oncol.* 92 (1), 225-231.

27- Lima, B.M.C.; Golub, J.E.; Mattos, A.T.; Freitas, L.B.; Spano, L.C.; Miranda, A.E. (2009). Human Papillomavirus in Women With and Without HIV-1 Infection Attending an STI Clinic in Vitoria, Brazil. *J. Int. Assoc. Physicians AIDS Care.* 8 (5), 286-290.

28- Lockwood-Rayermann, S.; McIntyre, S.J. (2009). Understanding HPV disease and prevention: a guide for school nurses. *J. Sch. Nurs.* 25(4), 261-269.

29- Lowy, D.R.; Howley, P.M. (2001). Papillomavirus. *In: Fields Virology* (eds 4). Lippincott Williams &Wilkins, Philadelphia, USA, CD-rom.

- 30- Luchters, S.M.; Vanden, B.D.; Chersich, M.F.; Nel, A., Delva, W.; Mandaliya, K.; Depuydt, C.E.; Claeys, P.; Bogers, J.P.; Temmerman, M (2010). Association of HIV infection with distribution and viral load of HPV types in Kenya: a survey with 820 female sex workers. *BMC Infect Dis.* 26, 10-18.
- 31- Luque, A.E.; Jabeen, M.; Messing, S.; Lane, C.A.; Demeter, L.M.; Rose, R.C.; Reichman, R.C. (2006). Prevalence of human papillomavirus genotypes and relate abnormalities of cervical cytological results among HIV-1-infected women in Rochester, *New York. J. Infect. Dis.* 194 (4), 428-434.
- 32- Manos, M.M.; Ting, Y.; Wright, D.K.; Lewis, A.J.; Broker, T.R.; Wolinsky, S.M. (1989). The use of polymerase chain reaction amplifications for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cell.* 7, 209-214.
- 33- Mausumi, B.; Showket, H.; Vilas, N. & Bhudev, C. (2009). HPV & HPV vaccination: Issues in developing countries. *Indian J. Med. Res.* 130 (3), 327-333.
- 34- McKenzie, N.D.; Kobetz, E.M.; Hnatyszyn, J.; Twiggs, L.B.; Lucci, J.A. (2009). Women with HIV are more commonly infected with non-16 and non-18 high-risk HPV types. *Gynecol. Oncol.* 116 (3), 572-577.
- 35- Menton, J.F.; Cremin, S.M.; Canier, L.; Horgan, M.; Fanning, L.J. (2009). Molecular epidemiology of sexually transmitted human papillomavirus in a self referred group of women in Ireland. *Viol. J.* 6, 112-118.
- 36- Minkoff, H.; Feldman, J.; DeHovitz, J.; Landesman, S.; Burk, R. (1998). A longitudinal study of human papillomavirus carriage in human immunodeficiency virus-infected and human immunodeficiency virus-uninfected women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 178 (5), 982-986.
- 37- Motti, P.G.; Dallabetta, G.A.; Daniel, R.W.; Canner, J.K.; Chipangwi, J.D.; Liomba, G.N.; Shah, K.V. (1996). Cervical abnormalities, human papillomavirus, and human immunodeficiency virus infections in women in Malawi. *J. Infect. Dis.* 173 (3), 714-717.

- 38- Oliveira, L.H.S.; Rodrigues, E.V.M.; Lopes, A.P.T.S.; Fernandes, A.P.; Cavalcanti, S.M.B.. (2003). HPV 16 detections in cervical lesions, physical state of viral DNA and changes in p53 gene. *São Paulo Med J.* 121, 67-71.
- 39- Oliveira, L.H.S.; Rosa, M.L.G.; Cavalcanti, S.M.B. (2008). Patterns of genotype distribution in multiple human papillomavirus Infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 14 (1), 60-65.
- 40- Oliveira, L.H.; Ferreira, M.D.; Augusto, E.F.; Melgaço, F.G.; Santos, L.S.; Cavalcanti, S.M.; Rosa, M.L. (2010). Human papillomavirus genotypes in asymptomatic young women from public schools in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 43 (1), 4-8.
- 41- Paesi, S.; Serafini, E.P.; Barea, F.; Madi, S.R.C.; Echeverrigaray, S. (2009). High Prevalence of Human Papillomavirus Type 58 in Patients With Cervical Pre-malignant Lesions in Southern Brazil. *J. Med. Virol.* 81 (7), 1270-1275.
- 42- Palefsky, J.M.; Minkoff, H.; Kalish, L.A.; Levine, A.; Sacks, H.S.; Garcia, P.; Young, M.; Melnick, S.; Miotti, P.; Burk, R. (1999). Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. *J. Natl. Cancer Inst.* 91 (3), 226-236.
- 43- Queiroz, C.; Travassos, A.G.; Studart, E.; Araújo, F.J.B.; Sarno, C.K.; Pinheiro, C.C. (2004). Prevalence of Human Papilloma Virus in HIV-Positive and HIV-Negative Patients in the State of Bahia. A Pilot Study. *Braz. J. Infect. Dis.* 8 (5), 356-362.
- 44- Rabelo-Santos, S.H.; Zeferino, L.; Villa, L.L.; Sobrinho, J.P.; Amaral, R.G.; Magalhães, A.V. (2003). Human Papillomavirus Prevalence among Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia III and Invasive Cervical Cancer from Goiânia, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98 (2), 181-184.
- 45- Rabkin, C.S.; Biggar, R.J.; Baptiste, M.S.; Abe, T., Kohler, B.A.; Nasca, P.C. (1993). Cancer incidence trends in women at high risk of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Int J Cancer.* 55, 208-212.

- 46- Ragin, C.C.R.; Wheeler, V.W.; Wilson, J.B.; Bunker, C.H.; Gollin, S.M.; Patrik, A.L.; Taioli, E. (2007). Distinct distribution of HPV types among cancer-free Afro-Caribbean women from Tobago. *Biomarkers*. 12 (5), 510-522.
- 47- Said, H.M.; Ahmed, K.; Burnett, R.; Allan, B.R.; Williamson, A.L.; Hoosen, A.A. (2009). HPV genotypes in women with squamous intraepithelial lesions and normal cervixes participating in a community-based microbicide study in Pretoria, South Africa. *J. Clin. Virol.* 44 (4), 318-321.
- 48- Smith, J.S.; Lindsay, L.; Hoots, B.; Keys, J.; Franceschi, S.; Winer, R.; Clifford, G.M. (2007). Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int. J. Cancer*. 121 (3), 621-632.
- 49- Stevens, M.P.; Garland, S.M.; Tan, J.H.; Quinn, M.A.; Petersen, R.W.; Tabrizi, S.N. (2009). HPV genotype prevalence in women with abnormal pap smears in Melbourne, Australia. *J. Med. Virol.* 81 (7), 1283-1291.
- 50- Sun, X.W.; Kuhn, L.; Ellerbrock, T.V.; Chiasson, M.A.; Bush, T.J.; Wright, T.C. Jr. (1997). Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med*. 337, 1343-1349.
- 51- Tanzi, E.; Amendola, A.; Bianchi, S.; Fasolo, M.M.; Beretta, R.; Pariani, E.; Zappa, A.; Frati, E.; Orlando, G. (2009). Human papillomavirus genotypes and phylogenetic analysis of HPV-16 variants in HIV-1 infected subjects in Italy. *Vaccine*. 27 Suppl 1, A17-23.
- 52- Tozetti, I.A.; Scapulatempo, I.D.L.; Kawski, V.L.; Ferreira, A.W.; Levi, J.E. (2006). Multiple Types of Human Papillomavirus in Cervical Samples in Women in Campo Grande, MS, Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 10 (5), 309-310.
- 53- Trottier, H.; Mahmud, S.; Costa, M.C.; Sobrinho, J.P.; Duarte-Franco, E.; Rohan, T.E.; Ferenczy, A.; Villa, L.L.; Franco, E.L. (2006). Human Papillomavirus Infections with Multiple Types and Risk of Cervical Neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 15 (7), 1274-1280.

54- Villa, L.L.; Ault, K.A.; Giuliano, A.R.; Costa, R.L.; Petta, C.A.; Andrade, R.P.; Brown, D.R.; Ferenczy, A.; Harper, D.M.; Koutsky, L.A.; Kurman, R.J.; Lehtinen, M.; Malm, C.; Olsson, S.E.; Ronnett, B.M.; Skjeldestad, F.E.; Steinwall, M.; Stoler, M.H.; Wheeler, C.M.; Taddeo, F.J.; Yu, J.; Lupinacci, L.; Railkar, R.; Marchese, R.; Esser, M.T.; Bryan, J.; Jansen, K.U.; Sings, H.L.; Tamms, G.M.; Saah, A.J.; Barr, E. (2006). Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus Types 6, 11, 16, and 18. *Vaccine*. 24 (27-28), 5571-5583.

55- Watt, A.; Garwood, D.; Jackson, M.; Younger, N.; Ragin, C.; Smikle, M.; Fletcher, H.; McFalane-Anderson, N. (2009). High-risk and multiple human papillomavirus (HPV) infectious in cancer-free jamaican women. *Infect. Agent. Cancer*. 4 Suppl 1, S11.

56- zur Hausen, H. (1996). Roots and perspectives of contemporary papillomavirus research. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 122 (1), 3-13.

Figure 1: Prevalence of the HPV types identified by Restriction Fragment Length Polymorphism in HIV seropositive and seronegative women, attending the STD-Aids clinic in Vitória, Southeastern Brazil, between March and December 2006.

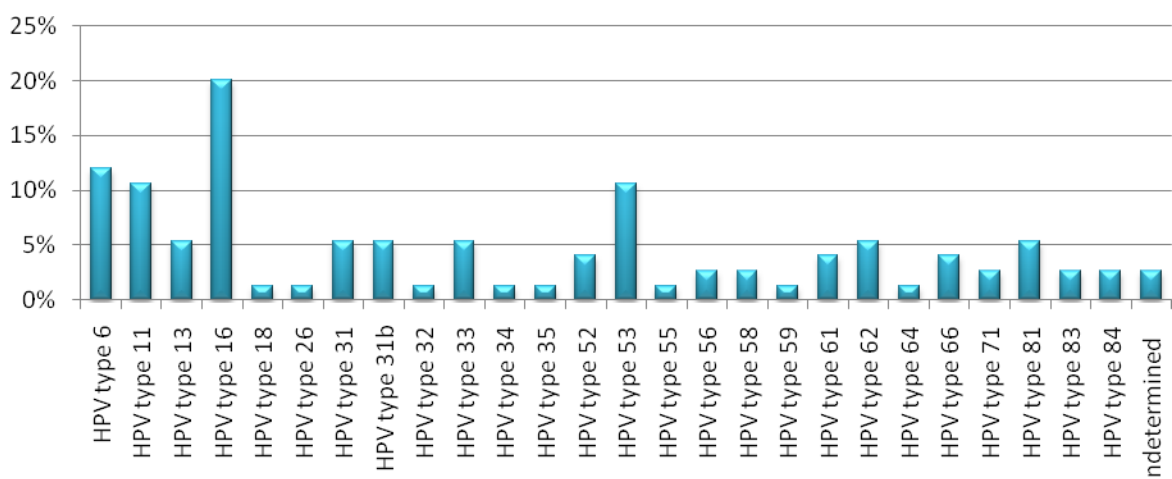


Table 1: Cytologic abnormalities and HPV type involved in HIV seropositive and seronegative women, attending the STD-Aids clinic in Vitória, Southeastern Brazil, between March and December 2006.

Cytology	HPV types*	HIV
Low SIL	6 (LR)	Negative
Low SIL	33 (HR)	Negative
Low SIL	13 (LR)	Negative
High SIL	66 (HR)	Positive
ASCUS	31 (HR)	Positive

LR: Low Risk; HR: High Risk