

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

LAYS PAULA BONDI VOLPINI

**GENÓTIPOS DE HPV EM ESPÉCIMES CERVICAIS E ANAIS DE
MULHERES SEM LESÃO CERVICAL E SOROPOSITIVAS PARA HIV**

VITÓRIA
2016

LAYS PAULA BONDI VOLPINI

**GENÓTIPOS DE HPV EM ESPÉCIMES CERVICAIS E ANAIS DE
MULHERES SEM LESÃO CERVICAL E SOROPOSITIVAS PARA HIV**

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 Doenças Infecciosas.

Orientadora: Dr^a. Liliana Cruz Spano.
Coorientadora: Dr^a. Angélica Espinosa Miranda.

VITÓRIA

2016

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

V933g Volpini, Lays Paula Bondi, 1990 -
Genótipos de HPV em espécimes cervicais e anais de
mulheres sem lesão cervical e soropositivas para HIV / Lays
Paula Bondi Volpini – 2016.
108 f. : il.

Orientador: Liliana Cruz Spano.
Coorientador: Angélica Espinosa Miranda.

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

1. Papillomaviridae. 2. HIV. 3. Técnicas de Genotipagem.
I. Spano, Liliana Cruz. II. Miranda, Angélica Espinosa.
III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
da Saúde. IV. Título.

CDU: 61



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

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO


A mestranda LAYS PAULA BONDI VOLPINI apresentou a dissertação intitulada “GENÓTIPOS DE HPV EM ESPÉCIMES CERVICAIS E ANAIS DE MULHERES SEM LESÃO CERVICAL E SOROPOSITIVAS PARA HIV” 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.

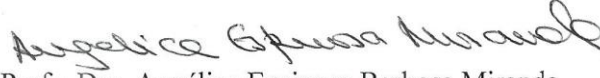
Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu (X) **aprovar** () **reprovar** a dissertação para habilitar a farmacêutica LAYS PAULA BONDI VOLPINI a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 04 de março de 2016


Profª. Dra. Sandra Lucia Ventorin von Zeidler
(Membro Externo)


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


Profª. Dra. Liliansa Cruz Spano
(Orientadora)


Profª. Dra. Angélica Espinosa Barbosa Miranda
(Coorientadora)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida.

Às minhas orientadoras Liliana Cruz Spano e Angélica Espinosa Miranda, pela oportunidade, exemplo, aprendizado e confiança.

À banca examinadora, Dra Sandra Ventorin von Zeidler e Dra Ana Paula Ferreira Nunes por aceitarem o convite e pela contribuição.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

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

À Dra Neide Tosatto Boldrini, por ter coletado as amostras deste estudo.

À Luciana Bueno de Freitas, pela companhia, amizade e auxílio na metodologia deste trabalho.

Às colegas do LabViG, pela companhia e momentos agradáveis.

À aluna Jayne Menezes, pelo auxílio na realização dos procedimentos laboratoriais.

Às colegas, Érica, Lia, Heloísa e Célia, pelas conversas e risadas diárias.

Às colegas do mestrado, Carla, Bruna e Lilian, pela força, incentivo e companhia.

Aos meus amigos e familiares, pela compreensão, apoio e oração.

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

RESUMO

A infecção pelo papilomavirus humano (HPV) é o principal fator de risco para o desenvolvimento de cânceres anogenitais. Alguns genótipos, denominados de alto risco (HR-HPV), e suas variantes gênicas estão mais associados ao desenvolvimento de lesões malignas, sendo o HPV16 o mais frequente. Fatores de risco, como a infecção pelo HIV, aumenta a propensão à infecção persistente pelo HPV e câncer. Metodologias moleculares para identificação e tipagem do HPV podem ser úteis para triagem de mulheres com citologia negativa, principalmente naquelas soropositivas para HIV. Este estudo teve como objetivo caracterizar os tipos de HPV e variantes de HPV16 em espécimes cervicais e anais de mulheres soropositivas para HIV, com citologia cervical normal, atendidas no Centro de Referência em DST/AIDS, Vitória-ES. DNA viral foi pesquisado por PCR com conjuntos de iniciadores PGMY09/11 a partir de ácido nucleico extraído com kit QIAamp DNA Mini Kit™ (QIAGEN). O genótipo foi determinado por *Reverse Line Blot* (RLB), *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) ou sequenciamento gênico e as variantes de HPV16, por sequenciamento gênico. DNA de HPV foi detectado em um total de 71,4% (90/126) das mulheres, sendo 38,9% (49/126) presentes em amostras cervicais e 60,3% (76/126), em anais; 38,9% (35/90), em ambos os sítios concomitantemente. Foram detectados 34 tipos distintos de HPV, sendo os HR-HPVs encontrados em 83,7% (41/49) e 77,6% (59/76) das amostras cervicais e anais, respectivamente. O HPV16 foi o tipo mais prevalente em ambos os sítios, seguido pelos tipos 45>31,35,44,69>18,52,66 na região cervical e pelos tipos 44>6>53 na região anal. Variante europeia de HPV16 esteve presente em 70,8% (17/24) dos casos e as não europeias, em 29,2% (7/24). Mesmo genótipo de HPV em ambos os sítios anatômicos esteve presente em 48,6% das amostras e destes, 76,5% eram HR-HPV. Infecção com pelo menos três tipos de HPV foi uma ocorrência comum, sendo na maioria dos casos, na região anal (78,6%). Dentre as variáveis estudadas, idade entre 18-35 anos, contagem de CD4 abaixo de 500 cél/mm³ e carga viral do HIV acima de 50 cópias/cél estiveram estatisticamente relacionadas à presença de HPV anal. A alta frequência de HR-HPV em mulheres de um grupo de risco e com citologia cervical normal contribui para que novas políticas de rastreio possam ser implementadas para o monitoramento dessa população.

Palavras-chave: HPV. HIV. Genotipagem. Variantes.

ABSTRACT

The human papillomavirus (HPV) infection is the main risk factor for the development of anogenital cancers. High-risk HPV (HR-HPV) genotypes and their variants are associated with the development of malignant lesions. Others risk factors, as HIV infection, increases the persistency of HPV infection and HPV-related cancer. Molecular methods for HPV detection and typing can be useful for triage of women with negative cytology, especially those HIV seropositive. This study aimed to characterize the HPV types and HPV16 variants in cervical and anal specimens of HIV seropositive women, with normal cervical cytology, attended at Reference Center for STD/AIDS, Vitória-ES. Viral DNA was screened by PCR with set of primers PGMY09/11 from nucleic acid extracted with QIAamp DNA Mini Kit™ (QIAGEN). The genotype was determined by Reverse Line Blot (RLB), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and genetic sequencing, and HPV16 variants, by sequencing. HPV DNA was detected in a total of 71.4% (90/126) of women, 38.9% (49/126) in cervical and 60.3% (76/126) in anal samples; 38.9% (35/90), at both sites concomitantly. Thirty-four HPV different types have been identified, being the HR-HPV found in 83.7% (41/49) and 77.6% (59/76) of cervical and anal samples, respectively. HPV16 was the most prevalent type in both sites, followed by types 45> 31,35,44,69> 18,52,66 in the cervical region and by types 44> 6> 53 in the anal region. European variant corresponded to 70.8% (17/24) of HPV16 cases and non-European, to 29.2% (7/24). A same HPV genotype was present in both anatomical sites in 48.6% of the samples, 76.5% were HR-HPV. Infection with at least three HPV types was common, being in most cases, in the anal region (78.6%). Among the variables investigated, age of 18-35 years, CD4 <500 cells/mm³ and HIV viral load >50 copies/cel were statistically related to the presence of anal HPV. The high frequency of HR-HPV in women of a risk group with normal cervical cytology reinforce the discussion concerning the improvement of screening policies of cervical cancer for this population.

Keywords: HPV. HIV. Genotyping. Variants

LISTA DE SIGLAS

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

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

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

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

CA - Câncer anal

CCU - Carcinoma de colo uterino

CR - Centro de Referência

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

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

DNAdf - DNA dupla fita

DST - Doenças Sexualmente Transmissíveis

E - *Early* (precoce)

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

EtBr - Brometo de Etídeo

EV- Epidermodisplasia verruciforme

FDA - *Food and Drug Administration*

GSK - GlaxoSmithKline

g - Força centrífugacional

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

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

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

HSH - Homens que fazem sexo com homens

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

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

IST - Infecção sexualmente transmissível

kb - Kilobases

L - *Late* (tardio)

LBA - *Line blot assay*

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

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

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

M - Molar

Min. - Minutos

mL - Mililitro

mM - Milimolar

MS - Ministério da Saúde

MSD - Merck Sharp & Dohme

NGS - *Next-generation sequencing* (Sequenciamento de nova geração)

NIA - Neoplasia intraepitelial anal

NIC - Neoplasia intraepitelial cervical

NIP - Neoplasia intraepitelial peniana

NK - *Natural killer* (Matadoras Naturais)

ng - Nanogramas

nm - Nanômetros

OMS - Organização Mundial de Saúde

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

PA - Puro para análise

pb - Pares de bases

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

pg - Picograma

PNI - Programa Nacional de Imunizações

pRb - Proteína do retinoblastoma

PV - *Papillomavirus*

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

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

RLU - *Relative light unit* (Unidades relativas de luz)

RNA - *Ribonucleic acid* (ácido ribonucléico)

Seg. - Segundos

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

SUS - Sistema Único de Saúde

TA - Temperatura ambiente

TARV - Terapia antirretroviral

uds - Unidades

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

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

µg - Microgramas

µL - Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Árvore filogenética dos papilomavírus.....	20
Figura 2 – Fotomicrografia eletrônica do HPV.....	21
Figura 3 - Genoma do HPV.	21
Figura 4 - Expressão de proteínas do HPV em epitélio estratificado.....	23
Figura 5 - Vias de endocitose do HPV.....	24
Figura 6 - Progressão de uma lesão benigna do colo do útero para câncer cervical invasivo.	27
Figura 7 - Resolução, latência e reativação da infecção por HPV.....	32
Figura 8 - Montagem dos monômeros de L1 e L2 gerando VLP e vírion.	33
Figura 9 - Diagrama esquemático de alguns testes para detecção do HPV.	37
Figura 10 - Genoma do HPV apresentado de forma linear	38
Figura 11 - Esquema do teste de Captura Híbrida (QIAGEN).	39
Figura 12 - Esboço e exemplo de hibridização reversa.....	41
Figura 13 - Fluxograma referente à metodologia.....	47
Figura 14 - Representação esquemática das etapas de extração do DNA.	48
Figura 15 – Produto de amplificação da região <i>L1</i> do genoma do HPV.	58
Figura 16 – Diagrama de Venn demonstrando casos positivos para HPV nos sítios cervical e/ou anal.	58
Figura 17 - Produto de amplificação do gene <i>β-globina</i>	59
Figura 18 - Filme radiográfico revelado após de reação de hibridização em linhas para genotipagem de HPV..	61
Figura 19 - Fragmentos obtidos através da técnica de RFLP.....	62
Figura 20 - Árvore filogenética inferida pelo método de <i>Neighbor-joining</i> a partir alinhamento global de sequências completas e parciais de nucleotídeos do genoma do HPV16.....	69

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Frequência dos tipos HPV nos sítios cervical e anal, determinados por RLB, RFLP e sequenciamento63
- Gráfico 2** – Frequência de HR-HPVs encontrados em amostras cervicais e anais obtidas de mulheres soropositivas para HIV, com citologia cervical negativa.....66

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** - Proteínas do HPV e suas funções.....22
- Quadro 2** - Tipos de HPV e apresentações clínicas.26
- Quadro 3** - Comparação entre as vacinas atualmente disponíveis34
- Quadro 4** - Iniciadores consensuais PGMY09/11 utilizados na detecção por PCR e posterior tipagem de HPV49
- Quadro 5** - Mistura para PCR para o gene *β-globina* e HPV.....50
- Quadro 6** - Programas de amplificação utilizados para gene *β-globina* e HPV.....50
- Quadro 7** - Sondas para Hibridização Reversa em Linhas.....52
- Quadro 8** - Iniciadores para a região *LCR* do HPV16.....53
- Quadro 9** - Sequências usadas como referência para alinhamento e análise filogenética de HPV16.....54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características demográficas, clínicas e comportamentais das mulheres participantes do estudo.	57
Tabela 2 – Odds Ratio (ORs) e intervalos de confiança de infecção por HPV exclusivamente cervical ou anal ou, concomitantemente cervical e anal, de acordo com as características demográficas, clínicas, e comportamentais das mulheres participantes do estudo.	60
Tabela 3 - Frequência dos casos positivos e negativos de HPV cervical e anal.....	61
Tabela 4 – Genótipos de HPV em amostras positivas para HPV cervical e/ou anal.	64
Tabela 5 – Tipos de HPV encontrados exclusivamente nos sítios cervical ou anal..	66
Tabela 6 – Frequência do número de tipos de HPV distribuídos nos sítios cervical e anal das mulheres positivas para HPV.....	67
Tabela 7 – Distribuição do número de tipos de HPV em infecção múltipla nos sítios cervical e anal das mulheres positivas para HPV.....	67
Tabela 8 – Frequência dos casos de infecção múltipla em relação à contagem de CD4 em mulheres positivas para HPV, nos sítios cervical e/ou anal.	67
Tabela 9 – Frequência de variantes de HPV16 distribuídas de acordo com sítio de detecção anal e/ou cervical	68

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	DESCRIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO	19
2.2	ESTRUTURA VIRAL	21
2.3	CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL	22
2.4	PATOGÊNESE E IMPLICAÇÕES CLÍNICAS	25
2.4.1	Desregulação da replicação e desenvolvimento de neoplasias associadas ao HPV	27
2.5	EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE COLO UTERINO E CÂNCER ANAL ..	29
2.6	RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO HPV	30
2.7	RELAÇÃO HPV-HIV.....	32
2.8	VACINAS PROFILÁTICAS.....	33
2.9	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	35
2.9.1	Métodos não moleculares	36
2.9.2	Métodos moleculares	37
2.9.2.1	Detecção viral.....	37
2.9.2.1.1	<i>Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)</i>	<i>37</i>
2.9.2.1.2	<i>Captura de Híbridos</i>	<i>38</i>
2.9.2.2	Determinação do genótipo	40
2.9.2.2.1	<i>Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição</i>	<i>40</i>
2.9.2.2.2	<i>Hibridização.....</i>	<i>40</i>
2.9.2.2.3	<i>Sequenciamento gênico.....</i>	<i>41</i>
3	OBJETIVOS	44
3.1	OBJETIVO GERAL	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4	METODOLOGIA.....	46
4.1	TIPO DE ESTUDO	46
4.2	POPULAÇÃO DE ESTUDO	46
4.3	ESPÉCIME CLÍNICO	46
4.4	DADOS CLÍNICOS.....	46
4.5	EXTRAÇÃO DO ÁCIDO NUCLÉICO	47
4.6	DETECÇÃO VIRAL	48
4.6.1	Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	48

4.7	DETERMINAÇÃO DO GENÓTIPO	50
4.7.1	<i>Reverse Line Blot (RLB)</i>	50
4.7.2	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)</i>	52
4.7.3	Sequenciamento gênico	52
4.8	DETERMINAÇÃO DAS VARIANTES DO HPV16	53
4.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	54
4.10	ASPECTOS ÉTICOS	55
5	RESULTADOS	57
5.1	AMOSTRAS	57
5.2	DADOS SÓCIO-DEMOGRÁFICOS, COMPORTAMENTAIS E CLÍNICOS..	57
5.3	DETECÇÃO DE DNA DO HPV	58
5.4	DETECÇÃO DO GENE β -GLOBINA.....	59
5.5	FATORES ASSOCIADOS À PRESENÇA DE HPV CERVICAL E ANAL.....	59
5.6	GENOTIPAGEM DE HPV	61
5.7	VARIANTES DO HPV16	68
6	DISCUSSÃO	71
7	CONCLUSÕES	80
	REFERÊNCIAS.....	82
	ANEXOS	101

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus pertencente à família *Papillomaviridae* e constituído por mais de 200 diferentes genótipos (HPV CENTER, 2016). Cerca de 40 deles possuem tropismo pela região anogenital e são classificados em tipos de baixo (LR-HPV) e alto risco (HR-HPV), conforme risco de progressão oncogênica (MUÑOZ et al, 2003, 2006; SMITH et al, 2007). Dentre os HR-HPVs, o HPV16 é o mais prevalente e encontrado em aproximadamente metade dos casos de carcinoma de colo uterino (CCU) e em cerca de 80% de câncer anal (CA) (CASTELLSAGUE, 2008; HOOTS et al., 2009; SMITH et al., 2007). Variantes são descritas dentro de um mesmo genótipo e podem diferir em suas propriedades biológicas e em potencial oncogênico (HILLER et al., 2006; TORNESELLO et al., 2000, 2004; XI et al., 1997, 2002, 2007). Estudos epidemiológicos e etiológicos dessas variantes investigam a transmissão de HPV intra e inter-populacional (TORNESELLO et al., 2007; XI et al., 2006).

O CCU é o quarto tipo de câncer mais frequente entre as mulheres em todo mundo com aproximadamente 500.000 novos casos por ano (INCA, 2016). Estudos epidemiológicos demonstraram que o HPV está presente em aproximadamente 100% deles (WALBOOMERS et al., 1999). O CA é o segundo câncer anogenital mais comum relacionado ao HPV (FORMAN et al., 2012). Embora raro na população em geral (1/100.000), a incidência é particularmente elevada entre as populações de homens que fazem sexo com homens (HSH), mulheres com história de CCU ou vulvar, e populações imunossuprimidas, incluindo aquelas soropositivas para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (DE MARTEL et al., 2012).

Alguns fatores de risco relacionados ao hospedeiro participam da progressão da lesão para o câncer, como exposição a outras infecções sexualmente transmissíveis (IST), principalmente pelo HIV (TROTTIER & FRANCO, 2006). Mulheres soropositivas para HIV são mais vulneráveis à infecção por HPV e de menor propensão em eliminar este vírus, o que aumenta o risco no desenvolvimento de lesões precursoras e câncer (CHIASSEON et al., 1997; MCKENZIE et al., 2009). Essas mulheres, principalmente aquelas com contagens de células CD4 mais baixas, apresentam maior prevalência de infecção por HPV genital e de cânceres relacionados quando comparadas a mulheres soronegativas para HIV (AHDIEH et al., 2001; DUERR et al., 2001; HOLLY et al., 2001; SUN et al., 1997).

Estudos mostram que mulheres com infecções simultâneas, anal e cervical, podem apresentar um mesmo perfil de genótipos em ambos os sítios, devido principalmente a uma fonte comum de infecção ou propagação de um sítio para o outro (PALEFSKY et al., 2001; SEHNAL et al., 2014; SHVETSOV et al., 2009).

Embora o rastreamento do CCU, em diferentes faixas etárias e periodicidade, seja recomendado na maioria dos países, sua incidência e mortalidade continua sendo grande nos países em desenvolvimento, devido a limitações metodológicas e/ou cobertura de triagem (WHO, 2010). Metodologias moleculares para identificação e genotipagem do HPV podem ser úteis para triagem de mulheres com citologia negativa, permitindo estratificá-las em diferentes categorias de risco para o desenvolvimento de lesões precursoras e câncer (MEIJER et al., 2006). Assim, considerando a persistência da infecção por HR-HPV como principal fator de risco para o desenvolvimento de cânceres anogenitais, o presente estudo caracterizou os tipos de HPV presentes no colo do útero e ânus, e descreveu as variantes gênicas do HPV16 em mulheres soropositivas para HIV, com citologia cervical normal, atendidas no Centro de Referência em DST/AIDS (CR-DST/AIDS), Vitória, ES. Este estudo contribui, portanto, para o conhecimento do perfil de genótipos de HPV nessas mulheres, fornecendo dados para que novas políticas de rastreamento possam ser implementadas para o monitoramento dessa população de risco.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DESCRIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO

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

Os PVs são classificados em gênero, espécie e tipo com base na homologia da sequência de nucleotídeos da região *L1* de seu genoma (DE VILLIERS et al., 2004). Gêneros diferentes compartilham menos de 60% de similaridade e são designados por letras do alfabeto grego. Atualmente são descritos 39 gêneros, sendo os HPVs pertencentes aos gêneros *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* e *Nupapillomavirus* (ICTV, 2016) (Figura 1). Espécies diferentes dentro de um mesmo gênero apresentam de 60% a 70% de similaridade e tipos pertencentes a uma mesma espécie compartilham de 71% a 89% de similaridade (Figura 1). Identidade de 90 a 98% caracteriza um novo subtipo viral e, mais de 98% de identidade, constitui variante de um determinado tipo (BERNARD et al., 2010; DE VILLIERS et al., 2004). Essas variantes segregaram filogeneticamente com base em sua origem geográfica sendo classificadas como variantes Europeia (E), Africana (Af), Asiática (As), Asiático-americana (AA) e Norte-americana (NA) (HILLER et al., 2006; TORNESELLO et al., 2000, 2004; XI et al., 1997, 2002, 2007).

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

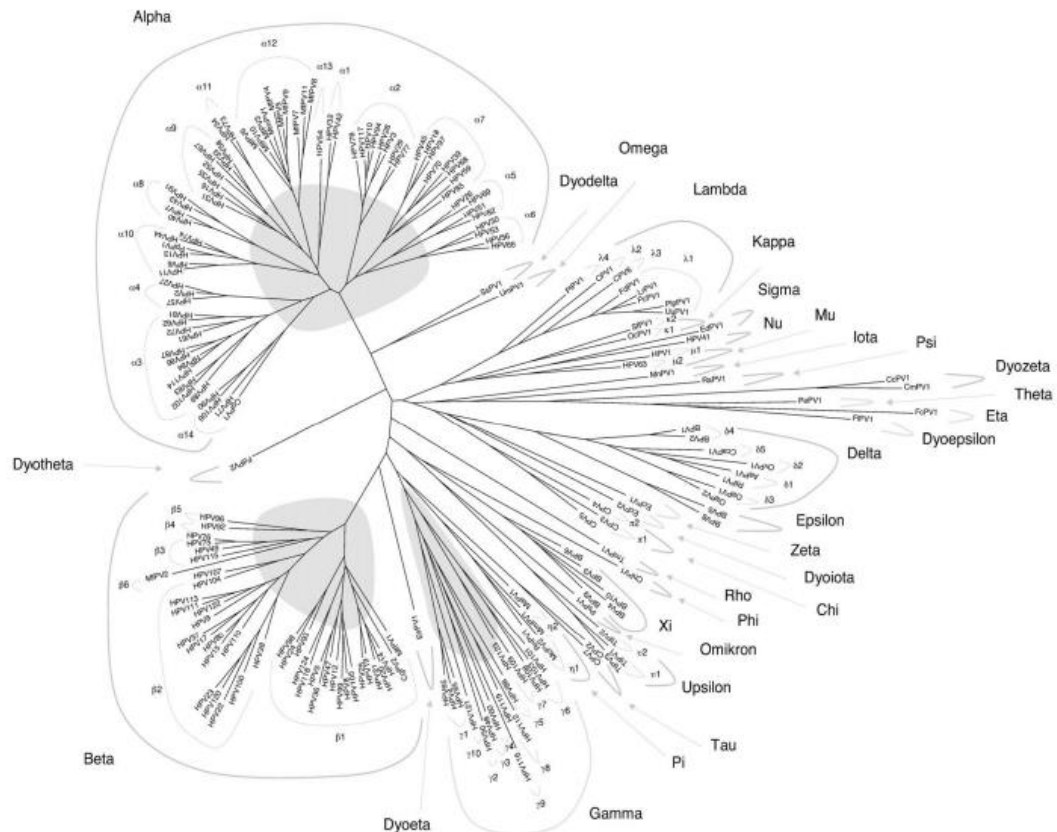


Figura 1 - Árvore filogenética dos papilomavírus. Árvore filogenética dos papilomavírus demonstrando os gêneros e seus respectivos tipos, humanos e não-humanos.

Fonte: BERNARD et al., 2010.

Devido à sua importância, os HPVs têm sido extensivamente estudados e mais de 200 tipos foram identificados (HPV CENTER, 2016). Destes, cerca de 40 infectam a região anogenital podendo ser classificados de acordo com a sua capacidade para progressão oncogênica, em HPVs de "alto risco" (HR-HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68), associados a um risco relativamente elevado de desenvolvimento de câncer, e "baixo risco" (LR-HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e 89), associados a proliferações epiteliais benignas (IARC, 2012; MUÑOZ et al., 2006). Os tipos 26, 53, 66, 73 e 82 têm sido classificados em "prováveis cancerígenos", devido à estreita relação filogenética com os tipos carcinogênicos estabelecidos, e tipos cuja oncogenicidade ainda não foi totalmente esclarecida (2a, 3, 7, 10, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 55, 57, 62, 67, 69, 71, 74, 77, 83, 84, 85, 86, 87, 90 e 91), em HPVs de "risco indeterminado" (IR-HPV) (MUÑOZ et al., 2006).

2.2 ESTRUTURA VIRAL

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

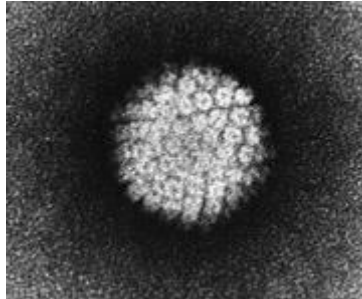


Figura 2 – Fotomicrografia eletrônica do HPV.

Fonte: National Cancer Institute, 2001.

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

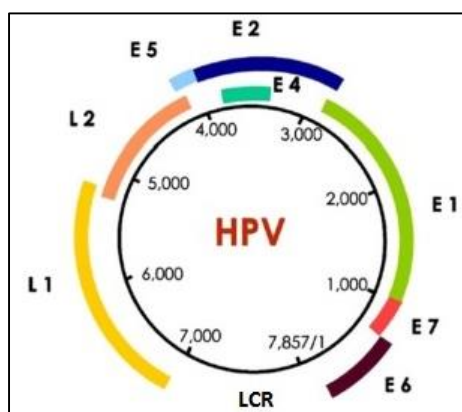


Figura 3 - Genoma do HPV.

Fonte: MUÑOZ et al., 2006, adaptado.

As proteínas do HPV recebem o mesmo nome de seus genes: proteínas não-estruturais E (E1-E7), e proteínas estruturais L (L1 e L2). A proteína E3 é encontrada apenas no BPV-1 (*Bovine papillomavirus*) (SYRJÄNEM & SYRJÄNEM, 2000). Algumas das funções desempenhadas pelas proteínas virais podem ser observadas no Quadro 1.

Proteínas	Funções
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
L1	Principal proteína do capsídeo, epítipo neutralizante
L2	Menor proteína do capsídeo, organização

Quadro 1 - Proteínas do HPV e suas funções.

Fonte: SYRJÄNEM & SYRJÄNEM (2000), adaptado.

2.3 CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL

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

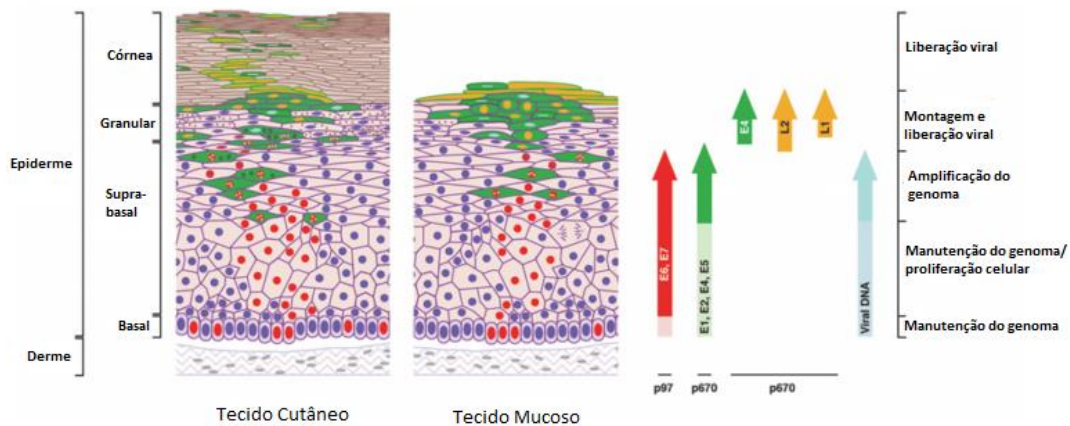


Figura 4 - Expressão de proteínas do HPV em epitélio estratificado. Expressão gênica do HPV dependente da estratificação do epitélio.

Fonte: DOORBAR,2006, adaptado.

A infecção das células basais do epitélio escamoso queratinizado e não queratinizado ocorre quando a integridade destes é comprometida por uma microabrasão ou outros traumas. Existem controvérsias quanto aos receptores primários e secundários para entrada do HPV nessas células, com proteoglicanos de heparam-sulfato e alfa-6-integrina, respectivamente, como importantes possibilidades (CULP & CHRISTENSEN, 2004; COMBITA et al., 2001; EVANDER et al., 1997; GIROGLOU et al., 2001; JOHNSON et al., 2009). A penetração nas células pode ocorrer através de endocitose independente ou dependente de clatrina ou caveolina, conforme o PV (BOUSARGHIN et al., 2003; DAY et al., 2003) (Figura 5). O desnudamento do vírus ocorre no endossoma tardio, disponibilizando o ácido nucléico, que então vai para o núcleo juntamente com a proteína L2 (Figura 5). Esta proteína auxilia a importação do genoma para a região perinuclear e para domínios transcricionalmente ativos (DAY et al., 2003).

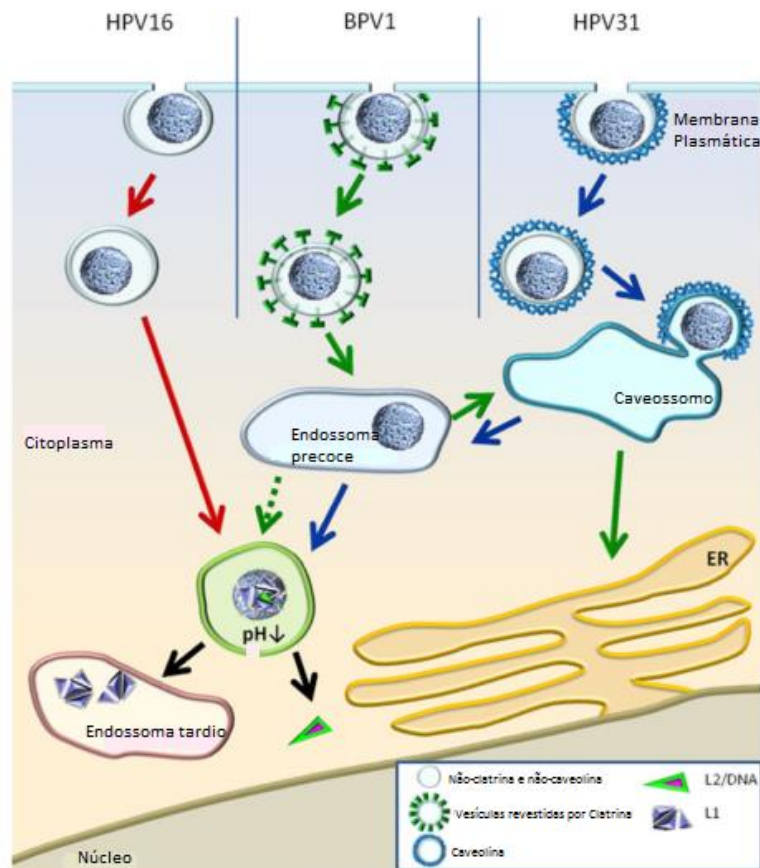


Figura 5 - Vias de endocitose do HPV. Diagrama esquemático dos mecanismos de entrada propostos para vários tipos de HPV. HPV16 é endocitado via clatrina- caveolina independente, enquanto BPV1 e HPV31 entram via vesículas revestidas com clatrina e caveolina, respectivamente.

Fonte: SAPP & BIENKOWSKA-HABA, 2009, adaptado.

O HPV se estabelece nas células basais na forma epissomal e em baixo número de cópias (cerca de 200 cópias por célula) (MCBRIDE, 2008; PARISH et al., 2006; PYEON et al. 2009). O padrão de expressão dos genes virais nestas células não está bem definido, mas acredita-se que as proteínas virais E1 e E2 sejam expressas a fim de manter o DNA viral como um epissoma e para facilitar a correta segregação do genoma durante a divisão celular (WILSON et al., 2002; YOU et al., 2004).

Para a produção de vírions infecciosos, o HPV deve amplificar seu genoma e empacotá-los em partículas infecciosas. A amplificação do genoma viral se inicia em um subgrupo de células no compartimento proliferativo e requer a expressão de todos os genes precoces virais, incluindo *E4* e *E5* (FEHRMANN et al, 2003; GENTHER et al., 2003) cujos papéis na replicação ainda não são totalmente compreendidos (Figura 4). A ligação de E2 à região LCR do HPV recruta a E1 DNA helicase para a origem de replicação viral, necessária para a replicação do DNA. As proteínas E6 e E7 trabalham

em conjunto permitindo que a diferenciação do epitélio seja retardada (SHERMAN et al., 1997) e ambas podem se ligar a proteínas reguladoras e estimular a progressão do ciclo celular (MUNGER et al., 2001). Existem diferenças funcionais entre as proteínas E6 e E7 de HR e LR-HPV que contribuem para diferentes padrões de expressão gênica (bem como diferentes funções dessas proteínas), desempenhando um papel importante na determinação do fenótipo da doença (KLINGELHUTZ & ROMAN, 2012). A proteína E7 se associa com membros da família de proteínas do Retinoblastoma (pRb) que são reguladoras negativas do ciclo celular, normalmente impedindo a entrada da célula na fase S pela associação com fatores de transcrição da família E2F. A ligação de E7 à pRb desloca E2F, independentemente da presença de fatores de crescimento externos, e conduz à expressão de proteínas necessárias para a replicação do DNA celular (MUNGER et al., 1989; MOODY & LAIMINS, 2010). A proteína E6 complementa o papel de E7 e previne a indução de apoptose em resposta à entrada não programada da célula na fase S, através de sua ligação à proteína p53 (LECHNER & LAIMINS, 1994; PIM & BANKS, 2010).

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

2.4 PATOGÊNESE E IMPLICAÇÕES CLÍNICAS

O HPV pode ser transmitido pelo contato direto ou indireto com o indivíduo infectado. Disfunções na barreira epitelial por traumatismos ou pequenas agressões provocam perda de solução de continuidade na pele ou mucosa, possibilitando a infecção viral (LETO et al., 2011).

De acordo com o tipo viral e o sítio de infecção, o HPV pode estar associado a uma variedade de condições clínicas, que se dividem em lesões benignas e malignas. Lesões benignas incluem verrugas comuns, plantares, genitais (condiloma

acuminado), papilomas orais, laríngeos, orofaríngeos e conjuntivais, neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) e epidermodisplasia verruciforme (EV). As lesões malignas associadas ao HPV incluem os carcinomas de células escamosas de orofaringe e cânceres anogenitais (HOWLEY & LOWY, 2007; ZUR HAUSEN, 2002) (Quadro 2).

A infecção genital pelo HPV conduz a uma de três consequências possíveis: (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 e; (iii) doença clínica (KOUTSKY, 1997).

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

Quadro 2 - Tipos de HPV e apresentações clínicas.

Fonte: DE VILLIERS, 2004, adaptado.

Nas infecções do colo do útero, as células infectadas pelo HPV podem sofrer alterações citológicas de graus variados, desde lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL), podendo progredir para lesão intraepitelial de alto grau (HSIL), até desenvolver o câncer (Figura 6). O HPV é encontrado em praticamente 100% dos casos de CCU (WALBOOMERS et al., 1999), cuja evolução está relacionada com a persistência do DNA viral e integração ao cromossoma celular (BOSCH et al., 2002). O CCU é precedido por uma longa fase de doença pré-invasiva, categorizada como NIC de

graus 1, 2 e 3, dependendo da proporção da espessura do epitélio que apresenta células maduras e diferenciadas (Figura 6).

O HPV também tem sido apontado como agente etiológico do CA. Este fato pode ser explicado pela presença de epitélio semelhante no canal anal e genital o que poderia favorecer a propagação do vírus nesses sítios (DALING et al., 2004; JIMÉNEZ et al., 2009; PALEFSKY, 2010). Desta forma, similarmente ao que ocorre no CCU, o CA é precedido por anormalidades celulares (LSIL e HSIL) ou neoplasia intraepiteliais anais (NIAs), também categorizadas em graus 1-3 (PALEFSKY et al., 1998).

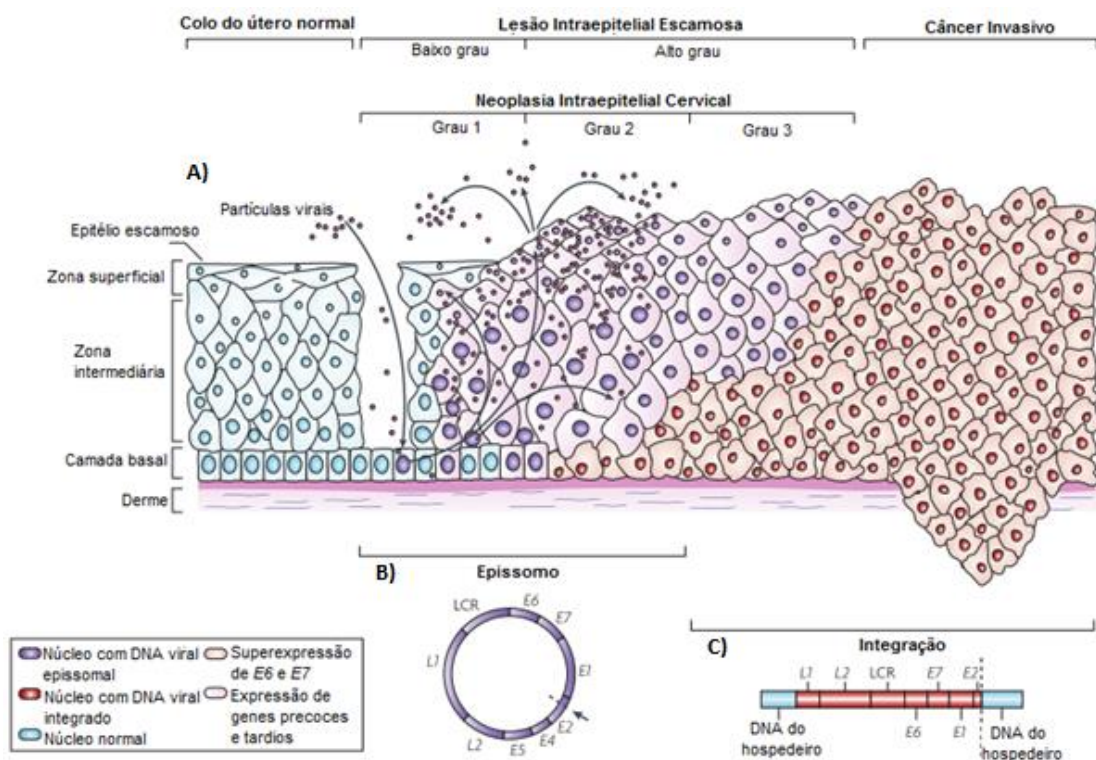


Figura 6 - Progressão de uma lesão benigna do colo do útero para câncer cervical invasivo. Em LSIL (NIC1), após a infecção, ocorre a expressão de genes precoces e replicação do DNA viral na forma epissomal. Nas camadas superiores do epitélio, genes tardios são expressos, permitindo o empacotamento do genoma e liberação das partículas virais (A). A progressão para HSIL (NIC2, e 3) e câncer, está associada ao rompimento de E2 (B) e integração do genoma do HPV ao cromossomo do hospedeiro (C), com aumento da expressão de E6 e E7 e diminuição da produção de partículas virais.

Fonte: WOODMAN et al., 2007, adaptado.

2.4.1 Desregulação da replicação e desenvolvimento de neoplasias associadas ao HPV

A expressão ordenada de genes que levam à produção de partículas virais é interrompida nas neoplasias associadas ao HPV. Nas NIC ocorrem mudanças no

padrão de expressão das proteínas, assim como na replicação do HPV, que é tanto menor quanto maior o grau de gravidade das lesões (DOORBAR, 2006). Em NIC1 quase não se observam alterações em relação ao epitélio normal; em NIC2 e 3, entretanto, há um atraso dos estágios tardios de replicação. Ainda, a replicação viral se restringe a uma área cada vez menor do epitélio até a não expressão de proteínas tardias e conseqüente ausência na produção de vírions no CCU (DOORBAR, 2006) (Figura 6).

Os níveis de *E6* e *E7* encontram-se aumentados quanto maior for o grau de NIC e essas mudanças na expressão gênica refletem diretamente o fenótipo neoplásico. A expressão aumentada de *E6* e *E7* na infecção por HR-HPV, que conduz às lesões de alto grau, NIC2+ (NIC2 ou NIC3), predispõe a célula ao acúmulo de alterações genéticas que contribuem para a progressão ao câncer. Desta forma, níveis relativamente mais baixos de *E6* e *E7* presentes em NIC1 não comprometem as funções de seus alvos celulares suficientemente para conduzir ao câncer. A desregulação gênica observada em NIC2+ parece facilitar a integração do episossoma viral no cromossomo da célula hospedeira. Nesses casos, a expressão gênica desregulada pode ser acionada por alterações na sinalização celular, através de alterações hormonais, ou modificações epigenéticas, tais como a metilação do DNA viral (DING et al., 2009; GARIGLIO et al., 2009).

Sítios frágeis comuns (CFS - *common fragile sites*) no genoma da célula hospedeira são considerados *hot spots* onde a integração é mais provável de ocorrer (THORLAND et al., 2003), resultando no rompimento de genes virais que regulam a transcrição normal. Um dos mais importantes, o gene *E2*, age como um fator de transcrição que regula a expressão de *E6* e *E7*. Integração e perda de regulação em *E6/E7* pode facilitar a expressão persistente de alto nível destes oncogenes (JEON et al., 1995 a, b) e o acúmulo de erros genéticos que, eventualmente, conduzem ao câncer (PETT et al., 2004). Nos últimos anos, tem se discutido sobre os eventos de integração do genoma viral, e ainda não está claro se os eventos de integração precoce em NIC1 conduziram à progressão de NIC2 e NIC3 ao câncer, ou se algum grau de desregulação na expressão de genes virais causaria instabilidade cromossômica e, assim, facilitaria a integração. Em geral, acredita-se que a integração ocorra em lesões de alto grau (NIC2+), e uma vez ocorrida, a expressão já desregulada de *E6* e *E7* pode aumentar ainda mais ou então ser mantida a um nível

constitutivo (HAFNER et al., 2008; MELSHEIMER et al., 2004). A expressão a longo prazo e, em particular, a superexpressão de *E6* e *E7* e o acúmulo de mutações genéticas, são em última instância importantes na progressão de NIC3 para o câncer (DOORBAR et al., 2012).

2.5 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE COLO UTERINO E CÂNCER ANAL

O HPV tem sido detectado em 99% dos CCU e em 80-90% dos CAs, sendo considerado o principal fator de risco para o desenvolvimento de cânceres anogenitais (DALING et al., 2004; DE VUYST et al., 2009; IARC, 2007; SCHIFFMAN & KJAER, 2003; WALBOOMERS et al., 1999).

O CCU representa umas das principais causas de mortalidade em mulheres, sendo diagnosticados a cada ano aproximadamente 500.000 novos casos, com uma mortalidade de cerca de 50% destes casos (HPV CENTRE, 2014). A maioria dos CCU corresponde ao carcinoma de células escamosas, seguido de adenocarcinoma. Estima-se que cerca de 16.340 casos de CCU ocorram no Brasil em 2016, correspondendo à quarta causa de morte de mulheres por câncer (INCA, 2016).

O CA é raro na população em geral, com uma incidência média de 1/100.000 e estimativa anual de 27.000 novos casos (DE MARTEL et al., 2012). Porém, a incidência é particularmente elevada entre as populações de HSH, mulheres com história de CCU ou vulvar, e populações imunossuprimidas, incluindo aquelas soropositivas para HIV e pacientes com história de transplante de órgãos. Estes cânceres são predominantemente carcinoma de células escamosas, adenocarcinomas, basalóide e cloacogênico (HPV CENTRE, 2014).

Além da infecção por HPV, alguns fatores de risco relacionados ao hospedeiro participam da progressão da lesão para o câncer como tabagismo, consumo de álcool, uso de contraceptivo hormonal, alimentação pobre em betacarotenos e vitamina C e D, assim como a idade da primeira relação sexual, o número de parceiros sexuais e exposição a ISTs, principalmente HIV. Fatores genéticos também podem influenciar no controle de infecção, porém ainda não são totalmente esclarecidos (SHIELDS et al., 2004; TROTTIER & FRANCO, 2006).

Fatores relacionados ao vírus, como o tipo de HPV, seus subtipos e variantes, a persistência e carga viral também desempenham papel fundamental como adjuvantes na progressão maligna (HOORY et al., 2008). Os HR-HPVs apresentam maior probabilidade de causar lesões persistentes e de estar associados a lesões pré-cancerosas. Estima-se, por exemplo, que o HPV16 seja responsável por 50-70% dos casos de CCU (CASTELLSAGUE, 2008; DIMAIO & LIAO, 2006; LIZANO et al., 2009; ZUR HAUSEN, 1996) e por cerca de 80% dos CA (HOOTS et al., 2009; HPV CENTRE, 2014).

Estudos epidemiológicos e etiológicos do câncer para investigar a transmissão de HPV intra e entre populações são realizados com variantes gênicas (TORNESELLO et al., 2007; XI et al., 2006). Isto tem sido demonstrado mais claramente para o HPV16, cujas variantes diferem em distribuição geográfica, em suas propriedades biológicas, em seu potencial oncogênico (HILLER et al., 2006; TORNESELLO et al., 2000, 2004; XI et al., 1997, 2002, 2007).

2.6 RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO HPV

A infecção por HPV é um evento comum, com mais de 80% das mulheres infectadas em algum momento de suas vidas. A maioria das infecções é resolvida espontaneamente, como resultado de uma resposta imunológica mediada por células, e não persiste tempo suficiente para a expressão genética desregulada e acúmulo de mutações. Acredita-se que o HPV16 possui um tempo médio de persistência mais longo do que a maioria dos outros HR-HPV, o que pode contribuir para o seu maior risco no desenvolvimento de câncer (KOSHIOL et al., 2006; SCHIFFMAN et al., 2010).

O HPV é capaz de evadir eficazmente do reconhecimento imunológico inato. O ciclo de vida produtivo viral é exclusivamente intraepitelial, não há nenhuma viremia, citólise ou morte celular, e a replicação viral e liberação do vírus não estão associadas com inflamação (STANLEY, 2012). O HPV regula negativamente as vias de sinalização imunológica inata nos queratinócitos infectados como citocinas pró-inflamatórias, particularmente interferon do tipo I, que não são liberadas, e os sinais para a ativação, migração e recrutamento de células dendríticas do estroma e macrófagos, que são inadequados (KANODIA et al., 2007). Além disso, as células produtivamente

infectadas que expressam proteínas virais abundantes são eliminadas a partir da superfície epitelial, longe das células imunitárias na circulação.

Embora tais estratégias contribuam para a persistência viral, na maioria dos casos as lesões são resolvidas com sucesso. Células T citotóxicas específicas para HPV podem ser detectadas em pacientes com infecção ou com infecção prévia por HPV (ALEXANDER et al., 1996; EVANS et al., 1996, 1997). 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 (*Virus Like Particles*) 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). O HPV possui muitos alvos (E2, E6, E7, L1 e L2) contra os quais os anticorpos podem ser gerados durante a infecção natural. Porém, as respostas de anticorpos dirigidos contra as proteínas precoces do HPV podem não ser clinicamente relevantes, pois estas proteínas são expressas inteiramente no interior da célula epitelial. No entanto, estas respostas, quando detectadas, são relativamente fracas, incluindo a resposta imunológica à proteína L1, o alvo principal de anticorpos neutralizantes. Estes anticorpos previnem a internalização dos vírions, por impedir uma alteração conformacional necessária para a ligação a um receptor secundário (EINSTEIN et al, 2009; VISCIDI et al, 2004, 2005).

Quando a regressão da lesão ocorre, esta não está associada com apoptose, mas com a substituição de células ativamente infectadas por "células aparentemente normais", ou seja, as células basais continuando sua divisão celular (Figura 7). Estas células "normais" (basais) ainda podem conter os genomas virais, mas sem concomitante expressão gênica. Por outro lado, tem sido sugerido que o ciclo de replicação do vírus pode tornar-se "reativado" subsequente à supressão imunológica ou alterações hormonais (Figura 7). Para que o câncer se desenvolva, o vírus precisa

evitar a detecção imunológica por um período prolongado, a fim de que anormalidades genéticas se acumulem (DE JONG et al., 2004; WELTERS et al., 2003).

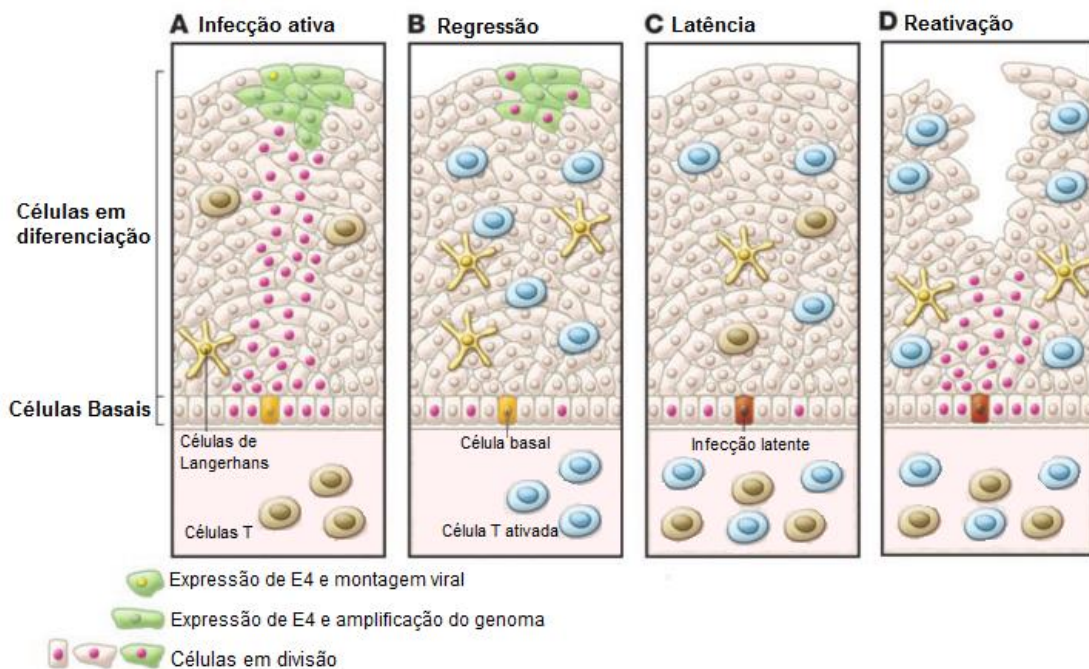


Figura 7 - Resolução, latência e reativação da infecção por HPV. (A) infecção ativa - amplificação do genoma e nova produção de vírions. (B) resposta imunitária eficaz conduz a uma regressão acompanhada por infiltração de células T, predominantemente. (C) a latência viral com genomas virais restritos a células da camada basal do epitélio. (D e E) Abrasão ou trauma pode estimular as células basais infectadas de forma latente a se dividir e desencadear reativação e estimulação das células T de memória do tecido.

Fonte: MAGLENNON et al., 2011, adaptado.

2.7 RELAÇÃO HPV-HIV

O HPV é responsável pela IST mais comum em todo o mundo e, como mencionado anteriormente, está associado ao desenvolvimento de cânceres anogenitais (IARC, 2007). A infecção pelo HIV altera a história natural da infecção pelo HPV, com menores taxas de regressão de LSIL e maior risco de progressão para HSIL e lesões invasoras resistentes ao tratamento, tornando-se necessárias mais intervenções e acompanhamento (NAUCLER et al., 2007; SUN et al., 1997).

Mulheres soropositivas para HIV são mais vulneráveis à infecção por HPV e possuem menor propensão em eliminar este vírus, o que aumenta o risco de desenvolver lesões e câncer nessa população (CHIASSON et al., 1997; MCKENZIE et al., 2009). Essas mulheres, principalmente aquelas com contagens de células CD4 mais baixas, possuem maior prevalência de infecção por HPV anal e cervical e de cânceres

relacionados com o HPV (AHDIEH et al., 2001; DUERR et al., 2001; HOLLY et al., 2001; SUN et al., 1997). Provavelmente este fato se deve aos riscos epidemiológicos compartilhados pelas duas infecções como início precoce da vida sexual, múltiplos parceiros e presença de outras ISTs (MAIMAN et al., 1998; QUEIROZ et al., 2004). Além disso, a interação entre as duas ISTs parece estar relacionada com a alteração na imunidade mediada por células, presente em pessoas infectadas pelo HIV (DENNY et al., 2012).

2.8 VACINAS PROFILÁTICAS

A infecção natural pelo HPV induz níveis baixos de anticorpos neutralizantes específicos contra a proteína principal do capsídeo L1, capazes de proteger parcialmente contra uma infecção subsequente em 50-70% das mulheres (WENTZENSEN et al., 2011). Apesar disso, as estratégias atuais de vacinas preventivas utilizam essa proteína como antígeno alvo, para induzir anticorpos neutralizantes e impedir a entrada de HPV nas células. A expressão de *L1* recombinante em vários tipos de células resulta em montagem espontânea de VLPs, que são imunologicamente e morfológicamente semelhantes à partícula viral do HPV (KIRNBAUER et al., 1992; ROSE et al., 1994; ZHOU et al., 1991) (Figura 8).

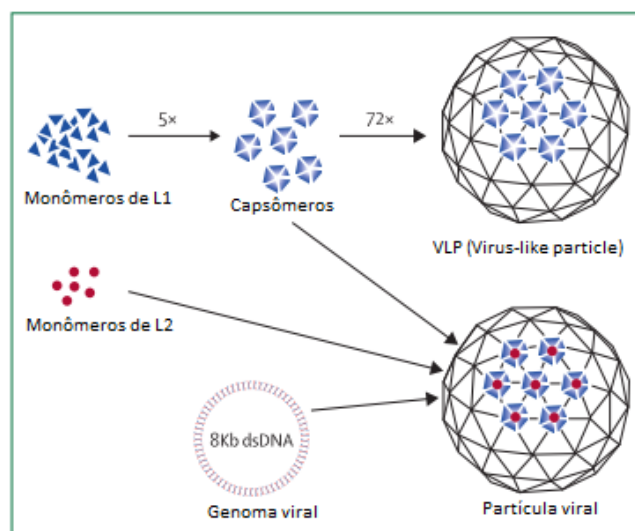


Figura 8 - Montagem dos monômeros de L1 e L2 gerando VLP (*virus-like particle*) e vírion.

Fonte: SCHILLER & MÜLLER, 2015, adaptado.

Três vacinas preventivas são aprovadas atualmente para uso (Quadro 3). A vacina quadrivalente, Gardasil® (HPV4, Merck Sharp & Dohme - MSD), protege contra a infecção por HPV tipos 6, 11, 16 e 18. Esta vacina foi licenciada em 2006 para uso em mulheres com idade entre 9-26 anos para a prevenção de CCU, cânceres vaginal e vulvar (FDA, 2009). Em 2009, o licenciamento foi ampliado para incluir também os homens nesta faixa etária, pois dados de ensaios clínicos demonstraram a eficácia dessa vacina na prevenção de verrugas genitais em ambos os sexos (CDC, 2010). A vacina bivalente, Cervarix® (HPV2, GlaxoSmithKline - GSK), fornece proteção contra os tipos de HPV 16 e 18, utilizada na prevenção do CCU (VILLA, 2006). Em dezembro de 2014, o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou a vacina nonavalente Gardasil 9® (HPV9, MSD), produzida usando tecnologia similar à da vacina quadrivalente (Quadro 3). Essa vacina é dirigida contra nove tipos de HPV (HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58), o que reduziria cerca de 90% dos casos de CCU e condilomas no mundo (SERRANO et al., 2012).

Desde 2009, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que a vacina contra o HPV seja incluída em programas nacionais de imunização (WHO, 2009). No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) aprovou o uso das vacinas quadrivalente e bivalente em agosto de 2006 e fevereiro de 2008, respectivamente, porém, a vacina não tinha sido incorporada em programas de imunizações públicas no Brasil até julho de 2013, quando foi aprovado o uso da vacina HPV4 no Sistema Único de Saúde (SUS) para meninas de 11 a 13 anos, a partir do primeiro semestre de 2014 (BRASIL, 2014).

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

Quadro 3 - Comparação entre as vacinas atualmente disponíveis. *Apenas para mulheres

Fonte: PETROSKY et al., 2015, adaptado.

Uma segunda geração de vacinas tem sido desenvolvida com diferentes abordagens. Uma delas compreende capsômeros de L1 (subunidade pentamérica de VLP) que podem ser produzidos em bactérias (YUAN et al., 2001). As vantagens seriam a redução de custos e estabilidade à temperatura ambiente, o que facilitaria a introdução dessa vacina em locais com poucos recursos. Embora os capsômeros de L1 induzam títulos de anticorpos neutralizantes mais baixos do que os VLPs, o nível de proteção é alto, mesmo sem a utilização de um adjuvante (JAGU et al., 2009; YUAN et al., 2001). Uma outra abordagem tem sido o desenvolvimento de vacinas com base na proteína L2 do capsídeo. Neste caso, a proteção é mediada por anticorpos neutralizantes que reconhecem epitopos lineares conservados na porção N-terminal de L2 (GAUKROGER et al., 1996; PASTRANA et al., 2005), cuja sequência é conservada mesmo em diversos tipos de HPV (GAMBHIRA et al., 2007, 2009). Entretanto, L2 não se organiza em VLPs e, portanto, é significativamente menos imunogênica do que as VLPs de L1, sugerindo a necessidade de um adjuvante ou exibição multimérica de L2 em um epitopo de uma VLP recombinante (JAGU et al., 2009; SCHELLENBACHER et al., 2009).

2.9 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

As seis principais aplicações clínicas para detecção do HPV são: (i) triagem de mulheres com alterações citológicas de baixo grau ou significado indeterminado; (ii) acompanhamento de mulheres com resultados anormais na triagem porém negativos na colposcopia/biópsia; (iii) prognóstico do resultado terapêutico após o tratamento de NICs; (iv) rastreio primário com teste para detecção de DNA do HPV, isoladamente ou em combinação com Papanicolaou, para detectar precursores do CCU (CUZICK et al., 2008); (v) obter informações sobre a persistência de certos tipos de HPV (PANNIER-STOCKMAN et al., 2008); e (vi) investigações de prevalência regional de genótipos de HPV para avaliar o impacto global da vacinação no futuro (BRUNI et al., 2010).

A presença de HPV pode ser inferida a partir de achados morfológicos, sorológicos e clínicos. No entanto, o diagnóstico de certeza da infecção pelo HPV se baseia em técnicas de biologia molecular que permitem a sua detecção e tipagem (VILLA &

DENNY, 2006). A seguir serão descritos tanto métodos não moleculares quanto moleculares de diagnóstico.

2.9.1 Métodos não moleculares

Introduzido por Papanicolaou em 1940, o exame citopatológico identifica alterações celulares benignas e malignas, sendo utilizado como teste de triagem para identificação de lesões precursoras do CCU (LEE et al., 2005). O exame de Papanicolaou consiste no estudo das células descamadas esfoliadas da ecto e endocérvice, e é atualmente o meio mais utilizado na rede de atenção básica à saúde por ser indolor, de baixo custo e eficaz (BEZERRA et al., 2005). A nomenclatura para as alterações citológicas utiliza terminologias propostas pelo Sistema de Bethesda (1991), revisto em 2001 (SOLOMON et al., 2002). Assim, este sistema reconheceu a distinção entre lesão de alto e baixo grau, com distinção explícita entre efeito da infecção pelo HPV (LSIL) e precursor do CCU (HSIL), além da incorporação dos termos ASCUS (células escamosas atípicas de significado indeterminado) e ASC-H (células escamosas atípicas, não se pode excluir lesão intraepitelial escamosa de alto grau).

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

Semelhante ao que ocorre no CCU, CA é precedido por alterações celulares (LSIL e HSIL) e NIAs, como mencionado anteriormente. Portanto, o rastreamento de lesões precursoras do CA pode ser realizado por meio da citologia anal, classificada de acordo com o sistema de Bethesda para citologia cervical. Anuscopia e biópsia da área suspeita são realizadas se qualquer anormalidade é encontrada na citologia anal (MITRA & CRANE, 2012).

2.9.2 Métodos moleculares

O HPV não pode ser propagado em cultura de tecidos e, portanto, na maioria dos casos a sua identificação depende de técnicas de biologia molecular, que consiste na detecção do DNA do HPV em espécimes clínicos (VILLA & DENNY, 2006). Atualmente, os ensaios de hibridização, amplificação de sinal e amplificação de ácido nucleico estão disponíveis (Figura 9) e alguns deles serão abordados a seguir.

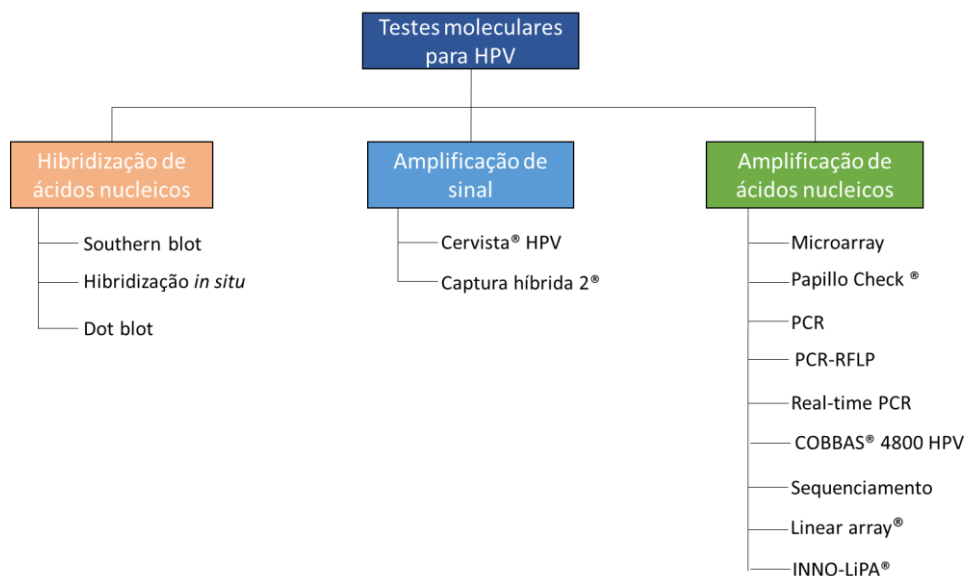


Figura 9 - Diagrama esquemático de alguns testes para detecção molecular do HPV.

Fonte: ABREU et al., 2012, adaptado.

2.9.2.1 Detecção viral

2.9.2.1.1 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

As técnicas baseadas em PCR são amplamente utilizadas e permitem a análise dos produtos amplificados por eletroforese em gel, *dot blot* ou hibridização, de polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP) ou de sequenciamento (DENNY & WRIGHT, 2005). A sensibilidade e especificidade variam dependendo do conjunto de iniciadores, do tamanho do produto de PCR, das condições de reação, do desempenho da DNA polimerase utilizada e da capacidade para detectar múltiplos tipos (IFTNER & VILLA, 2003). Os protocolos mais amplamente utilizados empregam iniciadores consenso que são dirigidos a uma região altamente conservada do gene *L1*, incluindo MY09/11,

PGMY09/11 e GP5+/6+. Estes iniciadores são capazes de detectar até 40 tipos diferentes de HPV (DENNY & WRIGHT, 2005).

O par de iniciadores MY09/11 é degenerado, com uma sequência de 24 nucleotídeos que gera um fragmento de 450 pb (MANOS et al., 1989). Os iniciadores PGMY09/11 foram desenvolvidos com o objetivo de melhorar a eficiência, a sensibilidade e a reprodutibilidade dos iniciadores MY09/11. São utilizados dois conjuntos de oligonucleotídeos não-degenerados, desenhados para amplificar os mesmos 450 pb, em vez de sequências degeneradas, aumentando assim a sensibilidade da amplificação em todo o espectro de tipos de HPV (GRAVITT et al., 2000). Os iniciadores GP5+/6+ geram um fragmento de 150 pb e é resultado de um aperfeiçoamento do par de iniciadores GP5/6, pela adição de dois ou três nucleotídeos, diminuindo a amplificação inespecífica e resultados ambíguos com o uso desses iniciadores (DE RODA HUSMAN et al., 1995) (Figura 10).

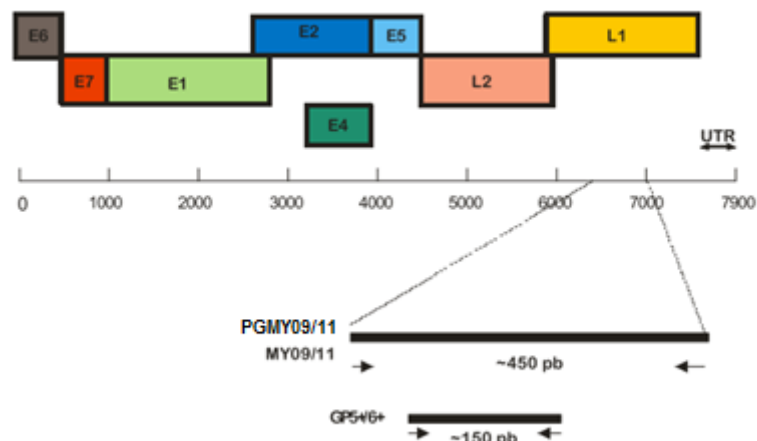


Figura 10 - Genoma do HPV apresentado de forma linear. A posição do início dos genes precoces (*E*), tardios (*L*), e da região não traduzida (*LCR*) está indicada, bem como as posições dos iniciadores mais amplamente utilizados: MY09/11 (MANOS et al., 1989), PGMY (GRAVITT et al., 2000) e GP5+/6+ (de RODA HUSMAN et al., 1995).

Fonte: MOLIJN et al. 2005, adaptado.

2.9.2.1.2 Captura de Híbridos

O sistema de captura de híbridos é um método de detecção de HPV através da amplificação de sinal com base na hibridização do DNA de HPV com sondas de RNA marcadas (LORINCZ, 1996). O ensaio não é capaz de determinar o tipo específico de HPV que está causando a infecção porque utiliza duas misturas de sondas de RNA

sintéticos: uma mistura de sondas que são complementares à sequência do DNA de 13 tipos de HR-HPV (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) e outra mistura de sondas complementares a cinco tipos de LR-HPV (HPV6, 11, 42, 43, 44) (MOLIJN et al., 2005; TSIODRAS et al., 2010).

O método para captura de híbridos requer inicialmente a desnaturação do DNA do HPV. Posteriormente, o DNA do HPV é hibridizado com cada uma das sondas da mistura, resultando na formação de híbridos de DNA-RNA específicos que são capturados por anticorpos anti-híbridos imobilizados em poços de uma microplaca. O excesso de anticorpos e as sondas não hibridizadas são removidos e os híbridos capturados são detectados por uma série de reações que dão origem a um produto quimioluminescente que pode ser medido por um quimioluminômetro. A intensidade da luz emitida, expressa em unidades relativas de luz (RLU), é proporcional à quantidade de DNA na amostra, proporcionando uma medida semi-quantitativa da carga viral. O valor de corte recomendado para um teste positivo é de 1,0 RLU (equivalente a 1 pg do DNA do HPV/mL, o que corresponde a 5.900 genomas por teste) (DENNY & WRIGHT, 2005) (Figura 11).

O limite de detecção de cerca de 5.000 genomas-equivalentes faz com que essa metodologia seja menos sensível do que a PCR (COPE et al., 1997, SMITS et al., 1995). Além disso, a reatividade cruzada das duas misturas de sonda pode reduzir a relevância clínica de um resultado positivo (CASTLE et al., 2002; POLJAK et al., 2002).

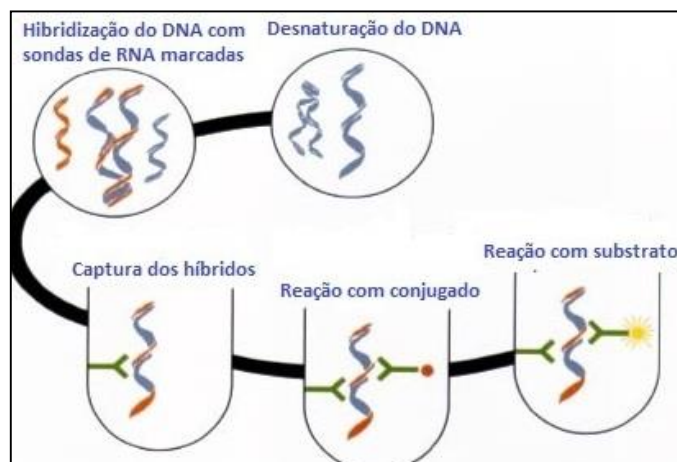


Figura 11 - Esquema do teste de Captura Híbrida conforme instruções do fabricante (QIAGEN).

Fonte: National Reference Laboratory for Papillomaviruses, Praga, 2015. Adaptado.

2.9.2.2 Determinação do genótipo

2.9.2.2.1 Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição

O polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP) baseia-se na diferença das sequências de DNA que podem ser detectados pela presença de fragmentos de diferentes comprimentos, após digestão do produto de PCR com enzimas de restrição. Os fragmentos de restrição resultantes são separados de acordo com os seus comprimentos, utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida ou de agarose. O método de RFLP mais frequentemente utilizado para tipagem de HPV consiste na digestão do produto gerado de 450 pb, com as enzimas de restrição, *Bam*HI, *Dde*I, *Hae*III, *Hin*fI, *Pst*I, *Rsa*I e *Sau*3A. O perfil de fragmentos produzidos pela digestão por cada enzima é específico para cada tipo de HPV (BERNARD et al., 1994) (ANEXO A).

2.9.2.2.2 Hibridização

A hibridização de ácidos nucleicos é um método sensível que, além de poder ser usado para a detecção de HPV em amostras clínicas, é capaz de identificar tipos específicos de HPV. Existem muitos formatos alternativos de teste de hibridização, sendo que a maioria deles usa filtros ou lâminas de vidro como suportes sólidos (MOLIJN et al., 2005; SCHIFFMAN, 1992).

A hibridização reversa consiste na hibridização simultânea de um produto de PCR com várias sondas de oligonucleotídeos, seguida por uma fase de detecção. A tecnologia mais utilizada é composta por uma tira de membrana de nylon ou nitrocelulose contendo várias sondas imobilizadas em linhas paralelas, denominado *line blot assay* (LBA), sendo os kits comerciais mais utilizados o INNO-LiPA HPV Genotyping Extra® (Innogenetics) e o *Linear Array*® (LA, Roche Diagnostics). O produto de PCR, gerado por iniciadores biotinilados, é desnaturado em condições alcalinas e adicionado à tira juntamente com um tampão de hibridização. Após a hibridização e lavagem rigorosas, os híbridos podem ser detectados pela adição de um conjugado de estreptavidina e de um substrato, gerando cor na linha de sonda, a qual pode ser interpretada visualmente. Este método permite a detecção de múltiplos tipos de HPV em uma única etapa e requer apenas uma quantidade limitada de

produtos de PCR (KLETER et al., 1999; MELCHERS et al., 1999; QUINT et al., 2001) (Figura 12).

A Hibridização Reversa em Linhas (*Reverse Line Blot* - RLB), descrita por Estrade et al. (2011), é um método *in house*, particularmente útil para a detecção de infecções específicas e de múltiplos genótipos, pois permite testar até 45 amostras em apenas uma reação, para 32 diferentes tipos de HPV genitais (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 66, 68, 69, 70, 73, 82, 83 e 84).

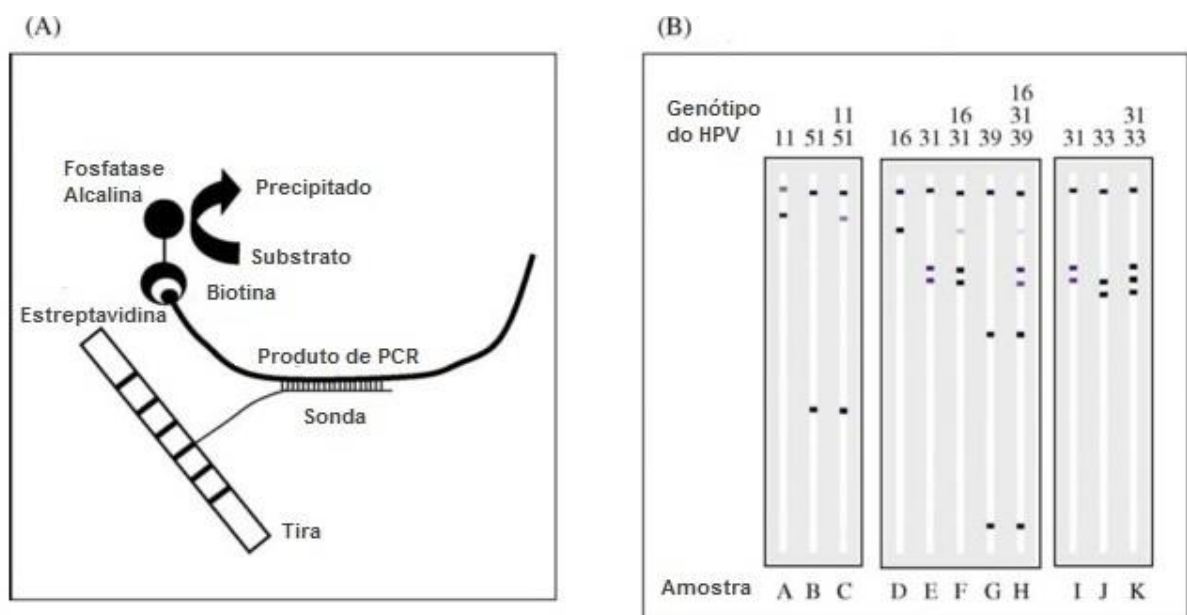


Figura 12 - Esboço e exemplo de hibridização reversa. (A) amplicons são desnaturados e hibridizados com sondas imobilizadas como linhas paralelas em uma faixa. Após lavagem rigorosa, os híbridos são detectados por estreptavidina conjugada com enzima e um substrato, obtendo-se uma reação de cor. (B) Os padrões de hibridização podem ser interpretados visualmente após alinhamento com um modelo de linha de sonda a partir de amostras que contêm genótipos de HPV únicos ou múltiplos.

Fonte: MOLIJN et al., 2005, adaptado.

2.9.2.2.3 Sequenciamento gênico

O sequenciamento de Sanger (1977), considerada tecnologia de "primeira geração" do sequenciamento de DNA, identifica sequências lineares de nucleotídeos por separação eletroforética de produtos de terminação da cadeia (SANGER et al., 1977). Os métodos automáticos utilizam terminadores marcados com fluorescência, separação por eletroforese capilar e detecção do sinal com laser para melhorar a detecção das sequências de nucleotídeos (PROBER et al., 1987). Este tipo de sequenciamento continua a ser a tecnologia mais disponível e sua química bem

definida o torna um método bastante preciso. Reações de sequenciamento de Sanger permitem a leitura de fragmentos de DNA de 500 pb a 1 kb de comprimento, e atualmente tem sido utilizado para tipagem do HPV, sendo considerado “padrão ouro” por permitir a identificação de praticamente todos os tipos, inclusive tipos novos e raros (ASATO et al., 2004; FONTAINE et al., 2007; KINGSMORE & SAUNDERS, 2011; LEE et al., 2007). Entretanto, quando a amostra clínica contém múltiplos genótipos, a identificação da sequência do DNA não é adequada, podendo subestimar a prevalência dos tipos, uma vez que pode ocorrer a amplificação apenas do tipo de maior prevalência na amostra (GONÇALVES et al., 1999; LEVI et al., 2002; MOLIJN et al., 2005). O termo sequenciamento de nova geração (NGS - *next-generation sequencing*) é utilizado para se referir às tecnologias de alto rendimento de sequenciamento de DNA disponíveis, capazes de sequenciar de um grande número de diferentes sequências de DNA em uma única reação, isto é, em paralelo, gerando centenas de megabases a gigabases de sequência de nucleotídeos em uma única corrida, dependendo da plataforma (LINNARSSON, 2010).

Através da técnica de sequenciamento, variantes de HPV podem ser identificadas, em particular para o HPV16, cujas alterações nucleotídicas em *E6*, *L1*, *L2* e *LCR* determinam as diferentes variantes, que apresentam diferentes distribuições geográficas e pontencial oncogênico (BERNARD et al., 2005; PANDE et al., 2008; YAMADA et al., 1995, 1997).

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Descrever os tipos de HPV e variantes de HPV16 encontrados em espécimes cervicais e anais de mulheres com citologia cervical normal e soropositivas para HIV, atendidas no Centro de Referência em DST/AIDS, Vitória-ES.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar os tipos de HPV encontrados em espécimes cervicais com citologia normal e anais;
- b) Descrever as variantes de HPV16 por sequenciamento gênico;
- c) Relacionar os tipos de HPV e variantes de HPV16 encontrados em espécimes cervicais com os anais;
- d) Identificar os fatores relacionados à infecção por HPV cervical, anal e em ambos os sítios.

4 METODOLOGIA

4.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo descritivo realizado em espécimes de escovado cervical e anal obtidas de mulheres soropositivas para HIV, com citologia cervical normal, atendidas no Centro de Referência em DST/AIDS (CR-DST/AIDS), Vitória-ES no período de agosto de 2013 a dezembro de 2015. Este estudo está inserido no projeto intitulado “Incidência e fatores determinantes de lesões precursoras do câncer anal em pacientes HIV positivos”.

4.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram convidadas a participar da pesquisa mulheres com idade entre 18 e 65 anos, atendidas no CR-DST/AIDS durante consulta ginecológica de rotina. Foram incluídas para fins do presente estudo somente aquelas que tivessem exame citológico normal. As coletas dos espécimes para pesquisa foram realizadas após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e questionário estruturado foi aplicado para obtenção de dados sócio-demográficos (ANEXO B). Foram critérios de exclusão a gravidez e o uso de anticoagulantes.

4.3 ESPÉCIME CLÍNICO

Os espécimes, constituídos por escovado endocervical e anal, foram coletados em atendimento de rotina no CR-DST/AIDS, por uma única médica ginecologista. As amostras foram armazenadas em tampão Tris-EDTA pH 7,4 e mantidas em freezer - 70°C. Os espécimes foram submetidos à pesquisa de HPV no Laboratório de Virologia e Gastroenterite Infecciosa (LabViG), UFES, sem conhecimento prévio da citologia. Na Figura 13 pode ser observado o fluxograma de processamento dos espécimes.

4.4 DADOS CLÍNICOS

Informações referentes à contagem de células CD4, carga viral de HIV e citologia cervical foram obtidas a partir do prontuário das pacientes.

Resultados citológicos dentro dos limites da normalidade e com alterações celulares benignas (INCA, 2012) foram considerados normais/negativos neste estudo.

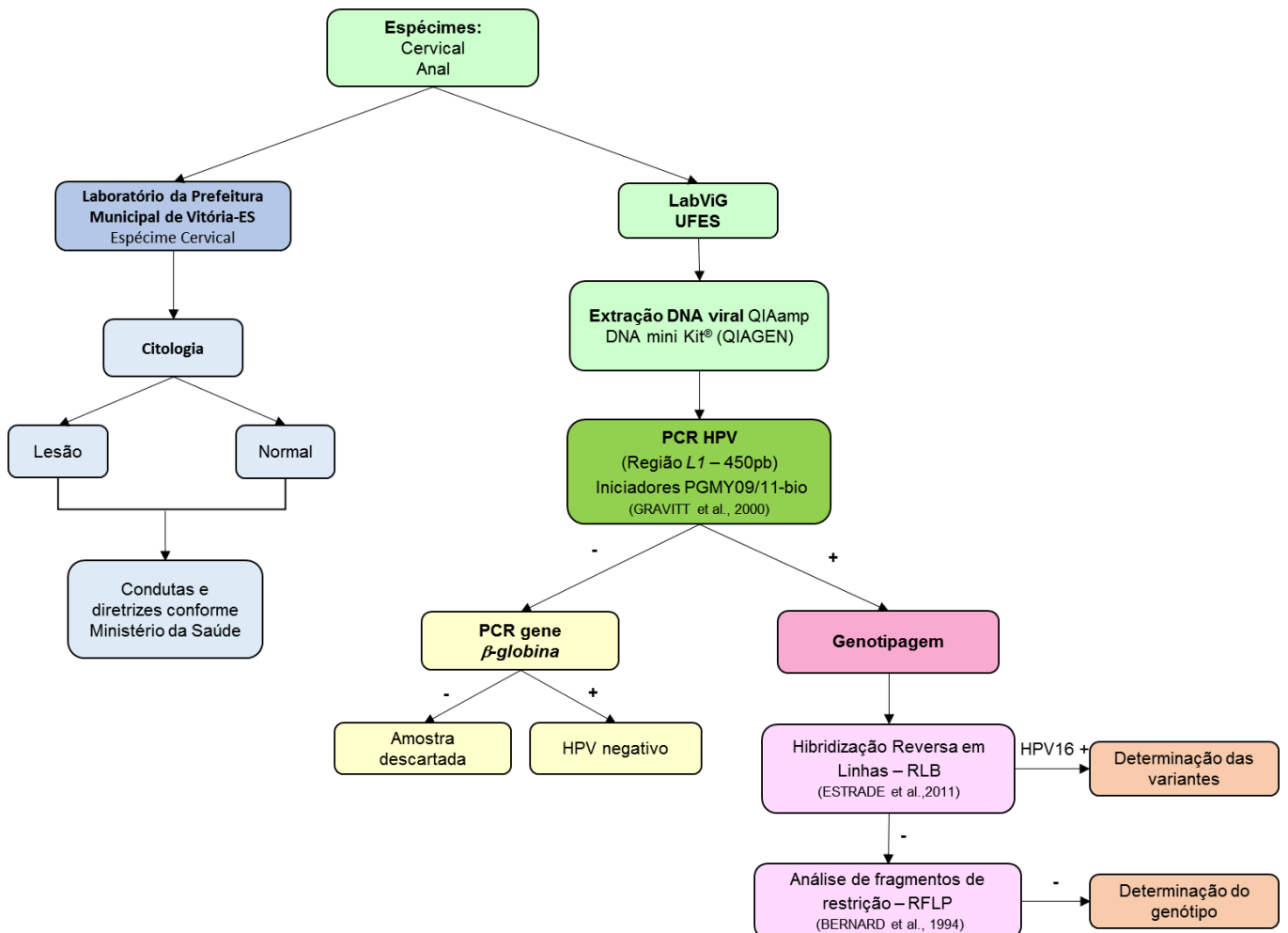


Figura 13 - Fluxograma referente à metodologia.

4.5 EXTRAÇÃO DO ÁCIDO NUCLEÍCO

A extração de ácido nucleico viral foi realizada utilizando-se o kit QIAamp DNA Mini Kit™ (Qiagen) (Figuras 13 e 14), conforme descrito a seguir. Em um tubo foram adicionados 20 µL de proteinase K, 200 µL de espécime cervical e 200 µL de tampão de lise (Tampão AL), que contém sais de guanidina, responsável pela lise celular e dissociação da nucleoproteína viral. A mistura foi homogeneizada durante 15 seg., incubada à 56°C por 10 min. e centrifugada rapidamente. Foram adicionados 200 µL de etanol PA aos tubos contendo amostra, homogeneizados por 15 seg. e centrifugados rapidamente. Esta solução foi aplicada à coluna contendo uma matriz de sílica e centrifugada a 6.000 x g, durante 1 min. O filtrado foi descartado e a coluna

foi transferida para um novo tubo coletor e a ela foram adicionados 500 μ L de tampão de lavagem (AW1), centrifugada a 6.000 x g por 1 min. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor, e o filtrado foi novamente descartado. À coluna foram adicionados 500 μ L de tampão de lavagem (AW2) e centrifugada a 20.000 x g durante 3 min. O filtrado foi descartado e coluna foi transferida para um tubo. Foram adicionados 60 μ L de tampão de eluição (AE) e procedeu-se incubação à temperatura ambiente (TA) por 5 min. Posteriormente a esse tempo foi realizada centrifugação a 6.000 x g durante 1 min. A solução final obtida contém o DNA do material clínico que foi mantido a -20°C até o momento da amplificação de segmentos específicos de HPV.

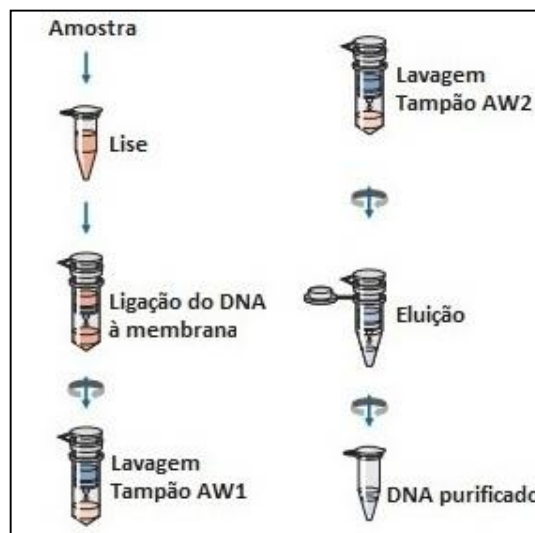


Figura 14 - Representação esquemática das etapas de extração do DNA com o kit QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN), adaptado do protocolo fornecido pelo fabricante.

4.6 DETECÇÃO VIRAL

4.6.1 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Deteção de DNA do HPV foi realizada utilizando-se sete microlitros do DNA extraído e submetido à amplificação pela técnica de PCR, utilizando os dois conjuntos de iniciadores PGMY09/11 (GRAVITT et al., 2000) (Quadro 4). Os iniciadores PGMY11 utilizados são biotinilados na porção 5' para realização da RLB descrita no item 4.6. As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 μ L, utilizando termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems®) (Quadros 5 e 6). Foram consideradas positivas amostras que apresentaram fragmentos de 450 pb.

Iniciadores		
Marcação	Designação	Sequência (5'-3')
Biotinilados	PGMY11-A	GCACAGGGACATAACAATGG
	PGMY11-B	GCGCAGGGCCACAATAATGG
	PGMY11-C	GCACAGGGACATAATAATGG
	PGMY11-D	GCCCAGGGCCACAACAATGG
	PGMY11-E	GCTCAGGGTTTAAACAATGG
Não Biotinilados	PGMY09-F	CGTCCCAAAGGAAACTGATC
	PGMY09-G	CGACCTAAAGGAAACTGATC
	PGMY09-H	CGTCCCAAAGGAAACTGATC
	PGMY09-I	GCCAAGGGGAAACTGATC
	PGMY09-J	CGTCCCAAAGGATACTGATC
	PGMY09-K	CGTCCAAGGGGATACTGATC
	PGMY09-L	CGACCTAAAGGGAATTGATC
	PGMY09-M	CGACCTAGTGGAATTGATC
	PGMY09-N	CGACCAAGGGGATATTGATC
	PGMY09-P	GCCCAACGGAAACTGATC
	PGMY09-Q	CGACCCAAGGGAAACTGGTC
	PGMY09-R	CGTCCTAAAGGAAACTGGTC
	HMB01	GCGACCCAATGCAAATTGGT

Quadro 4 - Iniciadores consensuais PGMY09/11 utilizados na detecção por PCR e posterior tipagem de HPV por hibridização reversa em linha.

Fonte: WHO, 2010.

As amostras negativas para DNA de HPV foram submetidas à amplificação do gene *β-globina*, realizada como controle de extração e de integridade do DNA, obtido com iniciadores específicos *sense* (5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3') e *anti-sense* (5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'), que geram um fragmento de 270 pb (HUANG et al., 1989).

A reação de amplificação foi realizada com cinco microlitros do DNA extraído adicionados a 20 µL da mistura de reação para PCR, conforme concentrações e programa de amplificação descrito nos Quadros 5 e 6. Os produtos de amplificação foram resolvidos em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio (EtBr) 0,5 µg/mL e visualizados sob luz ultravioleta em sistema de documentação de géis MiniBIS® Pro (BioAmérica).

Paralelamente à extração do espécime, foi realizada a extração de água livre de DNase e RNase como controle negativo de reação de amplificação. O preparo da mistura de reações e aplicação das amostras foi realizado em salas distintas, minimizando qualquer possibilidade de contaminação. Todas as reações de

amplificação foram realizadas no termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems®).

Reagentes da mistura para PCR	Concentração / volume (25 µL reação)	
	<i>β-globina</i>	HPV
Dxtp	0,2 mM	0,2 mM
Tampão de reação (10X)	5 µL	5 µL
MgCl ₂ 50mM:	1,5 mM	1,5 mM
Iniciadores:	0,32 µM 0,32 µM	40 pmol 40 pmol
Taq polimerase	0,05 uds	0,1 uds
DNA (amostra)	5 µL	7 µL

Quadro 5 - Mistura para PCR para o gene *β-globina* e HPV.

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

Quadro 6 - Programas de amplificação utilizados para gene *β-globina* e HPV.

4.7 DETERMINAÇÃO DO GENÓTIPO

Todos os espécimes positivos para HPV foram submetidos à técnica de RLB para determinação do genótipo viral. RFLP e sequenciamento gênico foram realizados para os casos em que o tipo não foi evidenciado por RLB.

4.7.1 Reverse Line Blot (RLB)

Produtos de PCR obtidos com PGMY09/11 biotinilados foram hibridizados com sondas ligadas covalentemente a uma membrana de *nylon* carregada negativamente (Biodyne C, PALL) (Quadro 7), seguindo as etapas descritas a seguir. Foram

adicionados a 10 µL do produto biotilado, 150 µL do tampão 2x SSPE - 0,1% SDS e incubados a 96°C por 10 min, para desnaturação do DNA, e posteriormente resfriado em gelo por 10 min. A membrana contendo as 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 *blotter* (GE, Amersham™). Foram aplicados 140 µL do produto diluído no *blotter* com a membrana posicionada de forma que as sondas ficassem localizadas transversalmente, sendo incubados em forno de hibridização a 51°C por 60 min. Após esse tempo, as amostras foram aspiradas e a membrana lavada por 20 min com tampão 2x SSPE - 0,5% SDS a 51°C. A membrana foi então incubada com conjugado (estreptavidina-peroxidase 1: 4000) em tampão 2x SSPE – 0,5% SDS em garrafa de rotação por 60 min a 42°C e então lavada com 150 mL de tampão 2x SSPE - 0,5% SDS por 20 min a 42°C com agitação, seguida por lavagem com tampão 2x SSPE por 10 min. à temperatura ambiente. Foram adicionados à membrana 5 mL de Reagentes de Detecção 1 e 2 (ECL, Amersham™) que, após incubação por um minuto, foi colocada entre duas folhas de acetato transparente dentro de um cassete radiográfico. Uma película radiográfica foi disposta sobre o acetato, para exposição durante 30 min. A placa foi revelada com reagentes radiográficos (Kodak), procedendo-se à análise dos resultados.

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	TACTTGGAGTAAATGTTGGG
HPV52_RHP	CTTTCCTTTAGGTGGTGTGTT
HPV53_RHP	AGACATAGACTGTGTGGTTGC
HPV54_RHP	TTATTAAAGCTATCCTGCCTG
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 73_RHP	GGCATACGTTGTAGTAGAGCT
HPV 82_RHP	TGCAACAGATTGAGTAACAGC
HPV 83_RHP	AGAGGCTGTGTATTCATTAGC
HPV 84_RHP	ATTCTGATTGGGTGTTGGTAG

Quadro 7 - Sondas para Hibridização Reversa em Linhas.

Fonte: WHO, 2010.

4.7.2 *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*

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

4.7.3 Sequenciamento gênico

Amostras não tipadas por RLB e RFLP foram submetidas à técnica de sequenciamento de Sanger a partir dos produtos amplificados utilizando os iniciadores PGMY, descritos anteriormente. Os produtos de amplificação foram resolvidos em gel de agarose, e em caso de banda única, 1 µl da preparação enzimática ExoProStar™ (GE Healthcare) foi adicionada a 5 µl de produto da PCR. Procedeu-se com a incubação a 37°C por 15 min. seguida de incubação a 80°C por 15 min. O produto purificado foi mantido a -20°C até sua utilização na reação de sequenciamento. Nos

casos em que houve a produção de fragmentos inespecíficos na PCR, o produto foi purificado diretamente do gel utilizando o PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen), conforme as etapas descritas a seguir. Após a visualização do gel sob luz UV, o fragmento de interesse foi recortado e pesado em um tubo. Para solubilização, foi adicionado 3x o volume do gel (peso/volume) de tampão de digestão (*Buffer L3*), e incubado por 10 min. a 50°C. Esta solução foi aplicada à coluna contendo uma matriz de sílica e centrifugada a 12.000 x g, durante 1 min. O filtrado foi descartado, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor e a ela foram adicionados 500 µL de tampão de lavagem (*W1*) e novamente centrifugada a 12.000 x g, por 1 min. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor, o filtrado foi descartado, e procedeu-se nova centrifugação a 20.000 x g durante 2 minutos. A coluna foi transferida para um tubo onde foram adicionados 50 µL de tampão de eluição (*E5*) e incubação à TA por 1 min. Posteriormente a esse tempo foi realizada centrifugação a 12.000 x g durante 1 min e a coluna foi descartada. A solução final corresponde ao produto da PCR purificado, que foi mantido a -20°C até sua utilização na reação de sequenciamento.

A reação de sequenciamento foi realizada com o kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems®), conforme instruções do fabricante. O produto desta reação foi precipitado com etanol-EDTA, eluído em formamida e submetido à eletroforese capilar no equipamento ABI 310 (Applied Biosystems®).

4.8 DETERMINAÇÃO DAS VARIANTES DO HPV16

Todas as amostras identificadas como HPV16 foram submetidas a uma reação de PCR com iniciadores para a região LCR do HPV16 (Quadro 8) que amplifica um fragmento comum às variantes. Para identificar as alterações nucleotídicas específicas de cada variante, foi realizada a técnica de sequenciamento de Sanger, conforme previamente descrito (item 4.6.3).

Iniciadores	Sequência de bases
<i>Sense</i>	5'-GCCAACCATTCCATTGTTTT-3'
<i>Anti-sense</i>	5'-GATTTTCGGTTACRCCCTTAG-3'

Quadro 8 - Iniciadores para a região LCR do HPV16

Fonte: CHEN, et al., 2015.

As sequências obtidas foram editadas utilizando-se software Bioedit software v7.2.5 (HALL, 1999), e então alinhadas com as sequências-referência de HPV16 para cada sublinhagem (BURK et al., 2013) (Quadro 9), utilizando o programa SeaView v4.5.4 (GOUY et al., 2010). A construção da árvore filogenética de todas as sequências alinhadas, pelo método de *Neighbor-joining*, foi realizada pelo software MEGA v6.0 (TAMURA et al., 2013).

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

Quadro 9 - Sequências usadas como referência para alinhamento e análise filogenética de HPV16.

Fonte: BURK et al., 2013, adaptado.

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as informações foram codificadas e armazenadas anonimamente em um banco de dados criado para este fim. Foi utilizado o programa estatístico *SPSS–data entry* (*Statistical Pacckage for the Social Sciences*), 20.0. Foi realizada análise descritiva, incluindo distribuição de frequência para variáveis qualitativas (dados demográficos, clínicos e comportamentais) e cálculo de média e desvio-padrão para variáveis quantitativas (idade e escolaridade). As possíveis associações entre as variáveis foram testadas por meio de testes de qui-quadrado, com correção de Yates ou teste de Fisher, quando apropriado. Frequências de HPV das amostras pareadas (cervical e anal) foram comparadas utilizando o teste de McNemar. *Odds Ratio* e intervalos de confiança foram calculados em análises bivariadas para estimar o grau de associação entre infecção e as variáveis demográficas. Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente signficante.

4.10 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde - UFES, nº 384.286 (ANEXO C), para coleta das amostras anais e emenda referente à coleta de amostras cervicais foi aprovada sob nº 1.254.427 (ANEXO D).

5 RESULTADOS

5.1 AMOSTRAS

Foram analisadas amostras de escovado cervical e anal de 126 mulheres, de um total de 133, com citologia cervical negativa, obtidas no período de agosto de 2013 a dezembro de 2015.

5.2 DADOS SÓCIO-DEMOGRÁFICOS, COMPORTAMENTAIS E CLÍNICOS

Os dados sócio-demográficos, comportamentais e clínicos da população de estudo estão apresentados na Tabela 1. A média de idade das pacientes envolvidas neste estudo foi de 41,4 anos (desvio padrão = $\pm 10,3$), e de escolaridade, 8,4 anos (desvio padrão = $\pm 3,7$). Devido à falta de dados para algumas variáveis do estudo, o tamanho da amostra variou para cada análise (Tabela 1).

Tabela 1 - Características demográficas, clínicas e comportamentais das mulheres participantes do estudo, atendidas no CRDST/AIDS, Vitória (ES), de agosto de 2013 a dezembro de 2015.

Características*	N (%)
Demográficas	
Estado Civil (n=124)	
Casadas	66 (53,2)
Solteiras	38 (30,6)
Separadas/Divorciadas/Viúvas	20(16,2)
Clínicas	
Uso de TARV**(n=125)	102 (81,6)
Carga viral HIV, nº de cópias (n=109)	
<50	70 (64,2)
50-400	7 (6,4)
>400	32 (29,4)
Contagem de CD4, /mm ³ (n=109)	
<200	6 (5,5)
200–500	32 (29,4)
>500	71 (65,1)
Comportamentais	
Fumantes (n=122)	23 (18,9)
Intercurso sexual anal (n=120)	82 (68,3)
Drogas ilícitas (n=120)	30 (25)

*O número variou devido à ausência de dados para algumas variáveis.

**TARV: Terapia antirretroviral.

5.3 DETECÇÃO DE DNA DO HPV

DNA de HPV foi detectado em 71,4% (90/126) nos sítios cervical e/ou anal das mulheres, sendo 38,9% (49/126) e 60,3% (76/126) em cada sítio, respectivamente (Figuras 15 e 16). Infecção anal e cervical concomitante ocorreu em 38,9% (35/90) dos casos positivos (Figura 16).

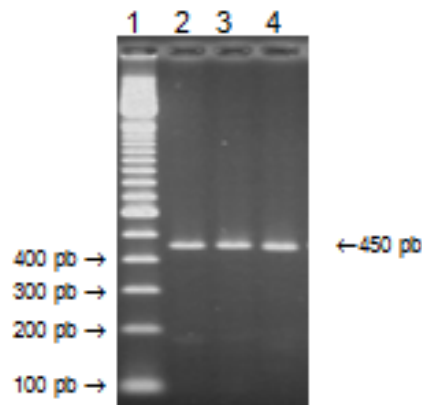


Figura 15 – Produto de amplificação correspondente à região *L1* do genoma do HPV. Eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com EtBr, do produto de amplificação de 450 pb do gene *L1*, utilizando iniciadores PGMY09/11 (GRAVITT et al., 2000). Col 1: padrão de peso molecular (100 pb); Col 2-4: amostras positivas para HPV.

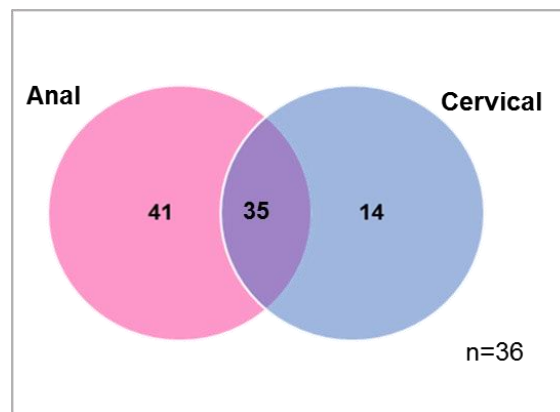


Figura 16 – Diagrama de Venn demonstrando casos positivos para HPV nos sítios cervical e/ou anal de amostras ($n=126$) obtidas de mulheres soropositivas para HIV com citologia cervical negativa.

5.4 DETECÇÃO DO GENE β -GLOBINA

Todas as 36 amostras negativas para DNA do HPV foram positivas para o gene β -globina, utilizado como controle de extração e de integridade de DNA, confirmando o resultado negativo para HPV (Figura 17).

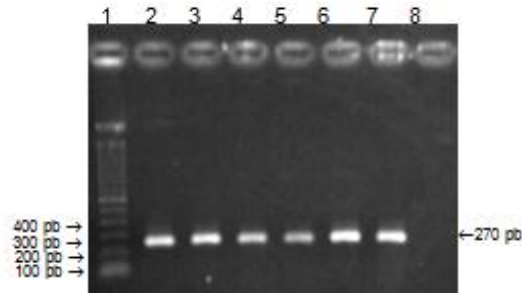


Figura 17 - Produto de amplificação do gene β -globina. Eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com EtBr, do produto de amplificação de 270 pb do gene β -globina, utilizando iniciadores 11/22 e 15/22 (HUANG et al., 1989). Col 1: padrão de peso molecular (100 pb); Col 2-7: amostras positivas; Col 8: controle negativo (extração de água).

5.5 FATORES ASSOCIADOS À PRESENÇA DE HPV CERVICAL E ANAL

Variáveis demográficas, clínicas e comportamentais (Tabela 1), foram utilizadas para analisar possíveis fatores de associação relacionados à presença do HPV nos sítios cervical, anal e em ambos. Destas variáveis, idade menor que 35 anos ($p=0,01$) contagem de CD4 abaixo de 500 cél/mm^3 ($p=0,01$) e carga viral do HIV acima de 50 cópias/cél ($p=0,001$) foram estatisticamente relacionadas apenas à presença de HPV anal. Não foram obtidos resultados estatisticamente significantes para as demais variáveis (Tabela 2).

Tabela 2 – Odds Ratio (ORs) e intervalos de confiança de infecção por HPV exclusivamente cervical ou anal ou, concomitantemente cervical e anal, de acordo com as características demográficas, clínicas, e comportamentais de mulheres soropositivas para HIV e com citologia cervical negativa, obtidas no CRDST/AIDS, Vitória-ES, de agosto de 2013 a dezembro de 2015.

Características*	Cervical (n=126)				Anal (n=126)				Anal/Cervical (n=90)			
	Pos	Neg	OR (IC95%)	P	Pos	Neg	OR (IC95%)	p	Pos	Neg	OR (IC95%)	p
Idade (anos)												
<35	13 (43%)	17 (57%)	0,78 (0,34-1,80)	0,6	24 (80%)	6 (20%)	0,29 (0,11-0,79)	0,01	13 (54%)	11 (46%)	2,36 (0,91-6,12)	0,07
>35	36 (38%)	60 (62%)			52 (54%)	44 (46%)			22 (33%)	44 (67%)		
Contagem de CD4 (cel/mm³)												
<500	19 (50%)	19 (50%)	0,45 (0,20-1,01)	0,05	29 (76%)	9 (24%)	0,34 (0,14-0,81)	0,01	16 (50%)	16 (50%)	2,54 (0,99-6,53)	0,05
≥500	22 (31%)	49 (69%)			37 (52%)	34 (48%)			13 (28%)	33 (72%)		
Carga Viral HIV (nº cópias)												
<50	24 (24%)	46 (66%)	1,48 (0,66-3,30)	0,3	34 (49%)	36 (51%)	4,8 (1,88-12,44)	0,001	13 (29%)	32 (71%)	0,43 (0,69-1,10)	0,07
≥50	17 (44)	22 (56%)			32 (82%)	7 (18%)			16 (48%)	17 (52%)		
Tabagismo												
Sim	9 (39%)	14 (61%)	0,93 (0,37-2,35)	0,9	12 (52%)	11 (48%)	1,54 (0,62-3,83)	0,3	7 (50%)	7 (50%)	1,80 (0,57-5,72)	0,3
Não	37 (37%)	62 (62%)			62 (63%)	37 (37%)			26 (36%)	47 (64%)		
Uso de drogas												
Sim	14 (47%)	16 (53%)	0,63 (0,27-1,46)	0,3	19 (63%)	11 (37%)	0,91 (0,39-2,14)	0,8	12 (57%)	9 (43%)	2,49 (0,92-6,79)	0,06
Não	32 (36%)	58 (64%)			55 (61%)	35 (39%)			23 (35%)	43 (65%)		
Intercurso sexual anal												
Sim	32 (39%)	50 (61%)	0,91 (0,41-2,01)	0,8	52 (63%)	30 (37%)	0,79 (0,36-1,74)	0,6	25 (42%)	34 (58%)	1,84 (0,70-4,84)	0,2
Não	14 (37%)	24 (63%)			22 (58%)	16 (42%)			8 (29%)	20 (71%)		
Escolaridade												
≤ 5 anos	11 (37%)	19 (63%)	1,03 (0,44-2,42)	0,9	15 (50%)	15 (50%)	1,76 (0,76-4,04)	0,2	8 (44%)	10 (56%)	1,47 (0,51-4,21)	0,5
>5 anos	34 (37%)	57 (63%)			58 (64%)	33 (36%)			24 (35%)	44 (65%)		

*O número variou devido à ausência de dados para algumas variáveis.

HPV anal foi detectado em 71,4% (35/49) dos casos positivos para HPV cervical (OR= 2,92; IC95%= 1,56-5,81; $p < 0,01$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Frequência dos casos positivos e negativos de HPV cervical e anal de 126 mulheres soropositivas para HIV e com citologia cervical negativa, atendidas no CRDST/AIDS, Vitória-ES, de agosto de 2013 a dezembro de 2015.

HPV cervical (n; %)	HPV anal (n; %)		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	35 (71,4)	14 (28,6)	49 (100)
Negativo	41 (53,2)	36 (46,8)	77 (100)
Total	76	50	126

5.6 GENOTIPAGEM DE HPV

Todas as amostras positivas para HPV (n=90) foram submetidas à metodologia RLB para determinação do genótipo viral (Figura 18). Tipos não determinados por RLB (HPV X) foram submetidas à RFLP (Figura 19), e os não evidenciados por RFLP, ao sequenciamento gênico.

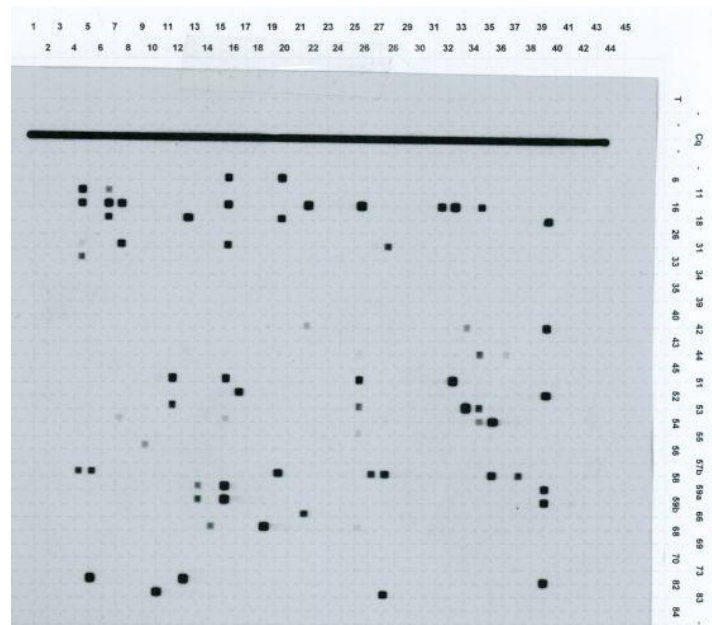


Figura 18 - Filme radiográfico revelado após de reação de hibridização em linhas (RLB) para genotipagem de HPV. Linhas verticais indicam as amostras e as horizontais os tipos de HPV pesquisados.

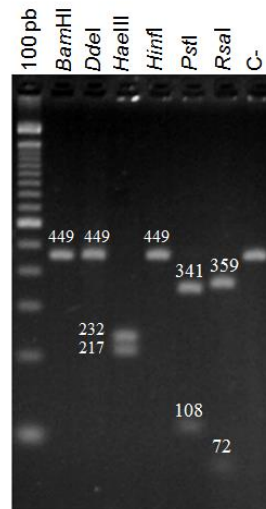


Figura 19 - Fragmentos obtidos através da técnica de RFLP Eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com EtBr, do produto de amplificação de 450 pb após digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI, *Dde*I, *Hae*III, *Hin*fI, *Pst*I, *Rsa*I, *Sau*3AI (BERNARD et al., 1994), evidenciando o HPV62.

Na Tabela 4 podem ser observadas todas as amostras positivas para HPV cervical e/ou anal (n=90) e os respectivos genótipos identificados através das três metodologias. RLB genotipou 84,4% (76/90) das amostras positivas para HPV. Das 14 amostras não tipadas por RLB, 11 foram caracterizadas por RFLP, que identificou os tipos 26, 52, 61, 62, 71, 81, 82 e 89 (Tabela 4). Juntas, essas técnicas genotiparam 96,7% (87/90) dos casos positivos. As três amostras não tipadas por ambas as metodologias, foram submetidas ao sequenciamento gênico, que identificou os IR-HPV62 e 74 e o tipo cutâneo 107 (Gráfico 1; Tabela 4). As três metodologias foram capazes de identificar 34 tipos, classificados como: (i) HR-HPV, 18 tipos, incluindo os tipos “prováveis cancerígenos” (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 e 82); (ii) LR-HPV, dez tipos (6, 11, 40, 42, 44, 54, 61, 70, 81 e 89); (iii) IR-HPV, cinco tipos (62, 69, 71, 74 e 83) e (iv) HPV cutâneo, tipo 107 (Gráfico 1; Tabela 4). Os genótipos de HPV encontrados exclusivamente nos sítios cervical ou anal estão descritos na Tabela 5.

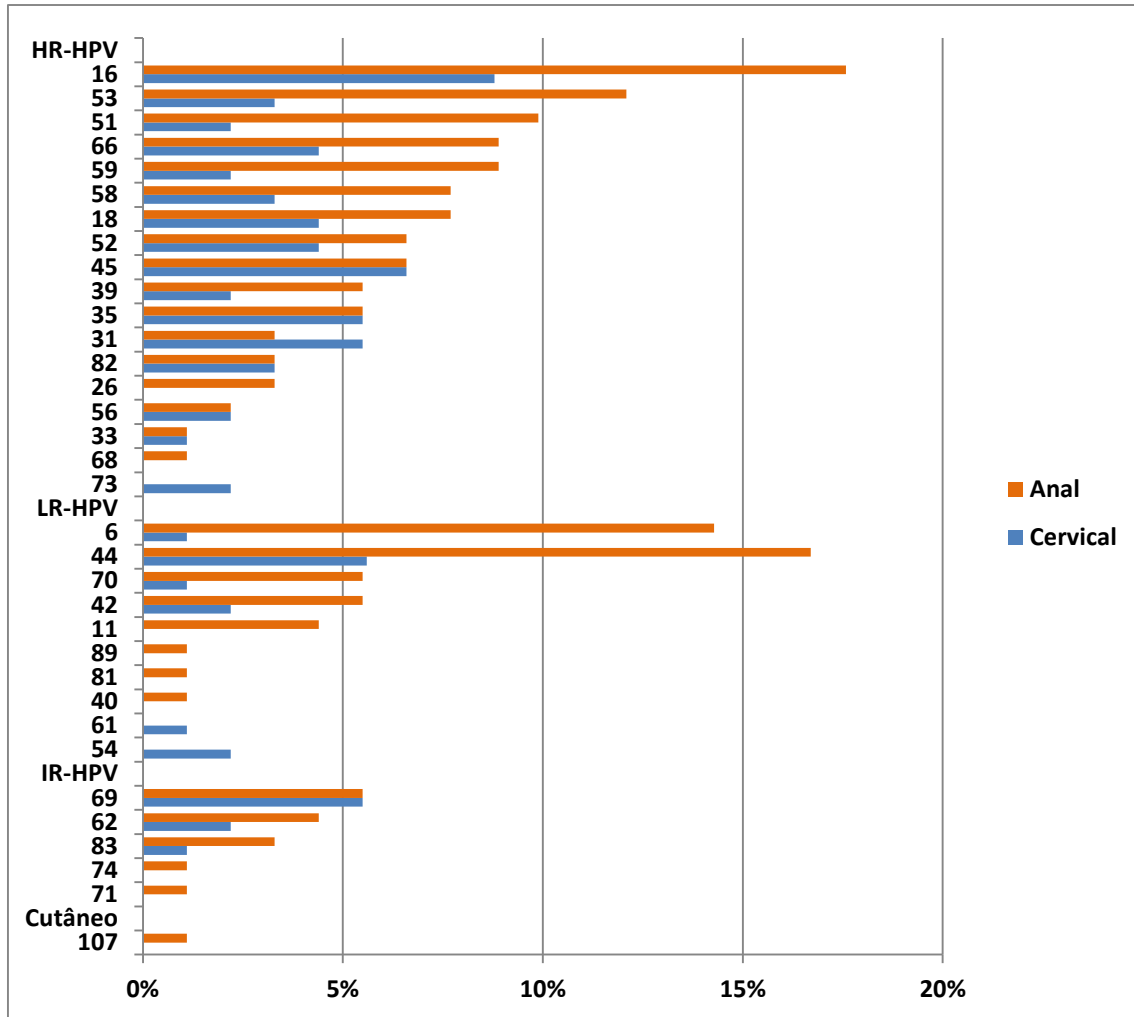


Gráfico 1 - Frequência dos tipos HPV nos sítios cervical e anal, determinados por RLB, RFLP e sequenciamento. No eixo X observa-se a frequência de casos positivos para cada tipo de HPV; no eixo Y, os tipos anogenitais de HPV identificados com suas respectivas classificações de risco ou cutâneo

Tabela 4 – Genótipos de HPV em amostras positivas para HPV cervical e/ou anal (n=90). HR-HPV estão em negrito e amostras não tipadas estão designadas com “X”.

(Continua)

Amostras*	RLB		RFLP	Sequenciamento
	HPV cervical	HPV anal		
01	6, 51	6		
02	69	6, 16, 31		
03	-	6, 44, 53		
04	-	X	X	74
05	-	11, 16		
06	18	X	62	
07	-	31		
08	16	16		
09	35, 44, 45, 56	35, 45, 53, 58, 59, 68		
10	-	X	X	107
11	X	11	X	62
12	-	18, 53		
13	-	45, 69		
14	31	53, 69		
15	16, 42, 44	-		
16	35, 53	-		
17	52	X	26, 52	
18	-	X	62	
19	45	-		
20	-	35, 51, 52, 69		
21	31, 45	-		
22	16, 33, 45, 66	6, 16, 59		
23	16, 73	6, 16, 66, 70		
24	52, 69	53, 69		
25	45	51		
26	-	51, 58, 70		
27	-	6		
28	42	42, 59		
29	31, 44, 69	16, 18, 44, 59, 69, 83		
30	82	16		
31	-	16, 51		
32	-	X	62	
33	-	51		
34	31	18		
35	45	6, 42, 44		
36	39, 53, 59, 69	16, 39, 59		
37	-	6		
38	-	53, 55, 58		
39	-	X	62	
40	51	16, 40		
41	44	6, 16, 44, 45, 59		
42	X	-	62	
43	39, 56	16, 18, 39		
44	66, 83	66, 83		
45	52	51		
46	18, 35, 52, 82	11		
47	-	X	81, 89	
48	-	82		
49	-	31, 33, 44		

Tabela 4 – Genótipos de HPV em amostras positivas para HPV cervical e/ou anal (n=90). HR-HPV estão em negrito e amostras não tipadas estão designadas com “X”.

(Conclusão)

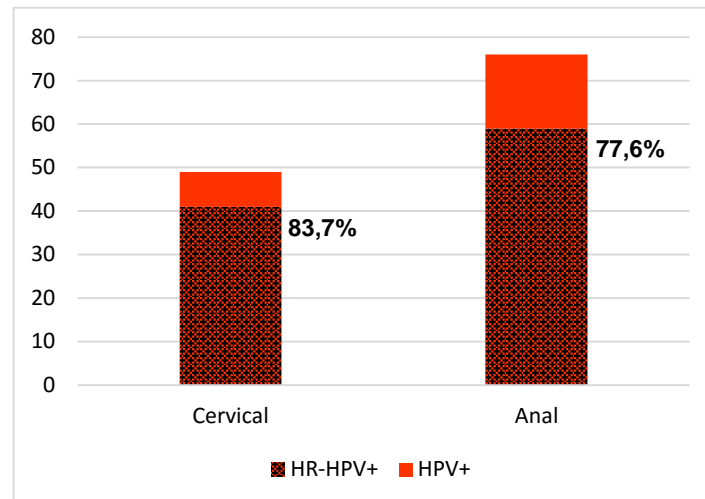
Amostras*	RLB		RFLP	Sequenciamento
	HPV cervical	HPV anal		
50	-	11, 39, 45, 52		
51	-	44		
52	59	X	71	
53	66, 69	44, 66		
54	-	X	82	
55	18, 31	18, 26, 42, 44, 51		
56	53	-		
57	-	6, 51, 53, 66		
58	-	16		
59	-	39, 52, 56, 58, 59, 66, 82		
60	-	18, 58		
61	-	16, 45		
62	58	-		
63	18, 54	52		
64	-	44, 53		
65	-	66		
66	-	6		
67	58	-		
68	44	-		
69	16	16		
70	X	44, 51, 83	61	
71	-	26,53		
72	-	16, 56, 58		
73	53	-		
74	-	45		
75	X	52	82	
76	53, 70	-		
77	16	-		
78	-	53		
79	35	6, 18, 59		
80	-	35, 42		
81	58	6, 39, 42, 70		
82	-	44, 45, 53		
83	-	35, 70		
84	-	70		
85	16, 73	-		
86	16, 66	44, 66		
87	54	35, 53		
88	35	-		
89	-	58		
90	-	66		

*Amostras numeradas de 01-90 conforme ordem de obtenção, não correspondendo necessariamente ao número de registro no laboratório

Tabela 5 – Génotipos de HPV encontrados exclusivamente nos sítios cervical ou anal.

Sítio	Tipos			
	HR-HPV	LR-HPV	IR-HPV	Cutâneo
Cervical	73	54, 61	-	-
Anal	26, 68	11, 40, 81,89	71, 74	107

Os HR-HPVs foram encontrados em 83,7% (41/49) das amostras cervicais e em 77,6% (59/76) das amostras anais (Gráfico 2). O HPV16 foi o tipo mais prevalente nos sítios cervical e anal (8,9% e 17,8%, respectivamente), seguido pelos tipos 45 (6,7%), 31, 35, 69, 44 (5,6% cada) e 18, 52, 66 (4,4% cada) na região cervical e pelos tipos 44 (16,7%), 6 (14,4%) e 53 (12,2%) na região anal (Gráfico 1).

**Gráfico 2** – Frequência de HR-HPVs encontrados em amostras cervicais e anais obtidas de mulheres soropositivas para HIV, com citologia cervical negativa.

Dentre os casos de infecção concomitante em ambos os sítios anatômicos (35/90), a presença de pelo menos um genótipo concordante ocorreu em 48,6% (17/35) e distintos em 51,4% (18/35) dos casos.

Na Tabela 6 está demonstrada a quantidade de tipos distintos de HPV encontrados por amostra, observando-se a presença de até quatro tipos nas amostras cervicais e de até sete tipos nas anais. Os casos de infecção múltipla com pelo menos três tipos distintos de HPV foram mais comuns nas amostras anais (78,6%) do que nas cervicais (21,4%) (OR= 2,9; IC95%= 1,09-7,83; p=0,03) (Tabela 7). Além disso, a presença de pelo menos dois tipos distintos de HPV (sítios cervical e/ou anal) foi maior nas

mulheres com contagem de CD4 menor que $<500 \text{ cé}/\text{mm}^3$ do que nas mulheres com contagem $\geq 500 \text{ cé}/\text{mm}^3$, embora estatisticamente não significativa ($p=0,06$) (Tabela 8).

Tabela 6 – Frequência do número de tipos de HPV distribuídos nos sítios cervical e anal das mulheres positivas para HPV ($n=90$).

Nº de tipos	Cervical (n; %)	Anal (n; %)
1	30 (61,2)	34 (44,7)
2	13 (26,5)	20 (26,3)
3	2 (4,1)	12 (15,9)
4	4 (8,2)	5 (6,6)
5	-	2 (2,6)
6	-	2 (2,6)
7	-	1 (1,3)
Total	49 (100)	76 (100)

Tabela 7 – Distribuição do número de tipos de HPV em infecção múltipla nos sítios cervical e anal das mulheres positivas para HPV ($n=90$).

Nº de tipos	Cervical (n; %)	Anal (n; %)	Total (n; %)
Até 2 tipos	43 (44,3)	54 (55,7)	97 (100)
≥ 3 tipos*	6 (21,4)	22 (78,6)	28 (100)
Total	49	76	125

* $p=0,03$

Tabela 8 – Frequência dos casos de infecção múltipla em relação à contagem de CD4 em mulheres positivas para HPV ($n=90$), nos sítios cervical e/ou anal.

Contagem de CD4	Infecção múltipla (≥ 2 tipos) (n; %)		Total
	Sim	Não	
$<500^*$	24 (75)	8 (25)	32 (100)
≥ 500	25 (54,3)	21 (45,7)	46 (100)

* $p=0,06$

5.7 VARIANTES DO HPV16

HPV16 foi detectado em 24 amostras de 20 mulheres deste estudo: quatro na região cervical, 12 na região anal e quatro em ambos os sítios (Tabela 9). Essas amostras foram submetidas à amplificação da região LCR do genoma do HPV16 e as sequências nucleotídicas foram comparadas com as sequências de referência de cada linhagem/sublinhagem de variantes de HPV16, demonstradas no Quadro 9 (item 4.7) (Figura 20).

Tabela 9 – Frequência de variantes de HPV16 distribuídas de acordo com sítio de detecção anal e/ou cervical, determinada por sequenciamento da região LCR do genoma viral.

Sítio	Variantes		Total
	Europeia	Não-europeia	
Cervical	4	-	4
Anal	7	5*	12
Cervical e anal	3	1**	4

*Asiático-americana (n=1); Africana 2a (n=4)

**Africana 2a

Variante europeia correspondeu a 70,8% (17/24) do HPV16 e as variantes não europeias, a 29,2% (7/24). Dentre as não europeias, a variante Africana 2a foi identificada em seis amostras e a Asiático-americana em uma. As mesmas variantes foram encontradas no colo do útero e ânus nos quatro casos em o HPV16 esteve presente em ambos os sítios.

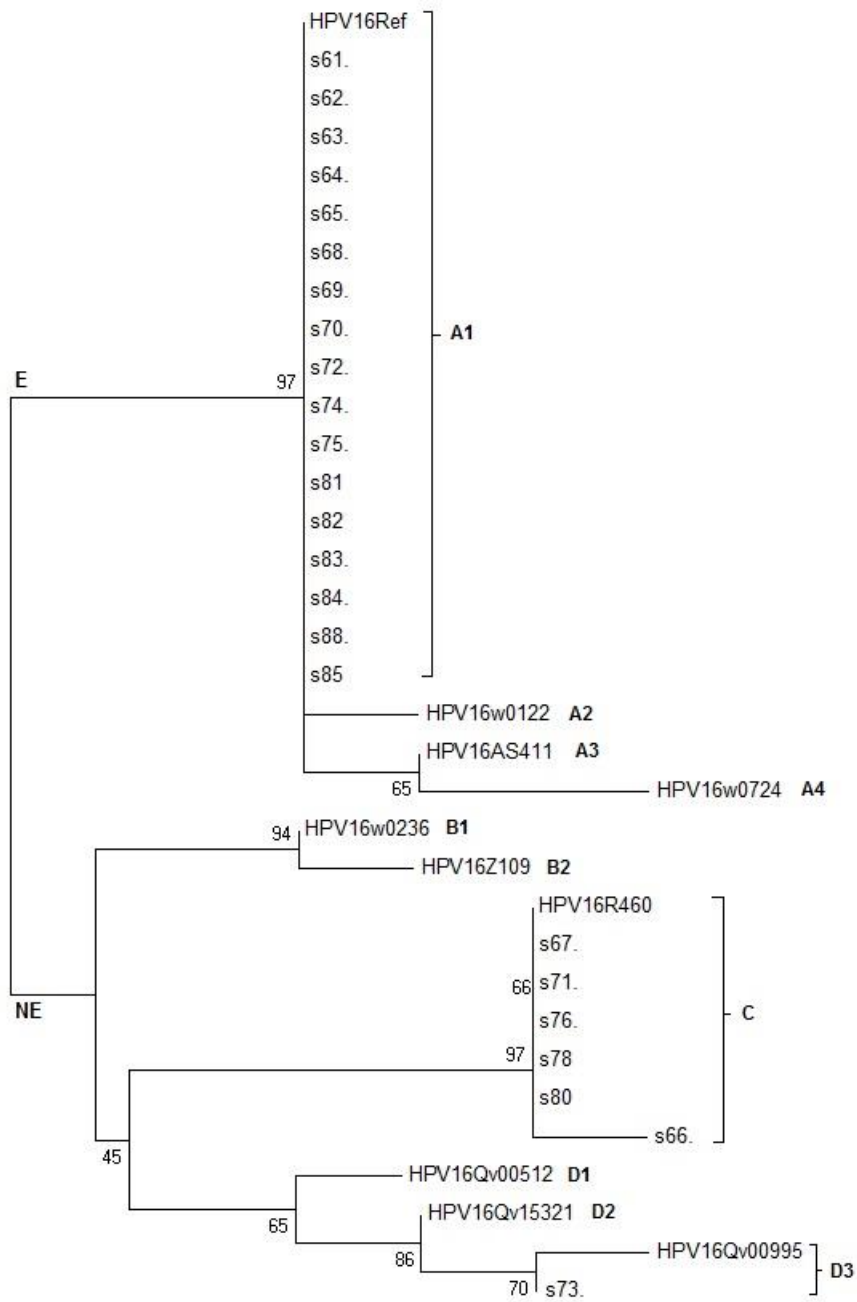


Figura 20 - Árvore filogenética inferida pelo método de *Neighbor-joining* a partir alinhamento global de sequências completas e parciais de nucleotídeos do genoma do HPV16. E – Variantes Europeias (Sublinhagens A1-A4); NE – Variantes não europeias (Sublinhagens B1-D3).

6 DISCUSSÃO

Metodologias moleculares para identificação e genotipagem do HPV podem ser consideradas uma ferramenta útil principalmente no monitoramento de mulheres com resultados citológicos duvidosos ou sem anormalidades. Esta estratégia permite a estratificação precoce de mulheres em diferentes categorias de risco para o desenvolvimento de lesões precursoras e câncer (CENTURIONI et al., 2005). Considerando que o HPV é a IST mais comum em todo o mundo, que a infecção persistente por HR-HPV no ânus ou colo do útero pode levar ao carcinoma invasivo e que as mulheres infectadas pelo HIV possuem um risco 5,4 vezes maior de desenvolverem o CCU e 6,8 vezes maior para CA do que as mulheres não infectadas (FRISCH et al., 2000; MELBYE & SPROGEL, 1991; ZBAR et al., 2002), este estudo investigou espécimes cervicais e anais de mulheres com citologia cervical normal que eram soropositivas para HIV. Os resultados obtidos revelaram alta prevalência de DNA de HPV (71,4%) nessa população, com mais de um terço das mulheres infectadas por HPV na região cervical (38,9%). Clifford et al. (2006), em uma meta-análise avaliando tipos de HPV em mulheres infectadas por HIV com citologia cervical normal, encontraram uma prevalência similar (36,3%) ao nosso estudo. Além disso, nossos resultados revelaram alta prevalência de HPV na região anal (60,3%), superior à do colo uterino. Este achado está em consonância com o previamente demonstrado por Palefsky et al. (2001) que, avaliando prevalência e fatores de risco relacionados à infecção por HPV, encontraram uma frequência de HPV anal também maior do que cervical (79% versus 53%) tanto em mulheres soropositivas quanto soronegativas para HIV, embora com menor frequência nestas (43% versus 24%). No Brasil, Gonçalves et al. (2008) avaliando infecção concomitante por HPV em diferentes sítios anogenitais (cervical, vaginal e anal) de mulheres soropositivas para HIV, também relataram maior frequência de HPV na região anal (63,7%) do que na cervical (61,6%). Giuliano et al. (2014) sugerem que a resposta imunológica ao HPV pode diferir de acordo com o sítio anatômico da infecção, o que pode explicar sua maior prevalência na região anal.

Interessantemente, história de sexo anal não esteve associada à presença de HPV na região anal. Na realidade, a associação entre sexo anal e infecção por HPV anal em mulheres também não foi estatisticamente significativa em outros estudos (KOJIC et al., 2011; PALEFSKY et al., 2001; PARK et al., 2009). Isso leva a sugerir que a

transmissão do HPV poderia ocorrer a partir da região cervico-vaginal para a mucosa anal sem que houvesse intercurso sexual anal, conforme também proposto por Moscicki et al. (2012). Desta forma, as mulheres deste estudo, sem anormalidades citológicas cervicais e sem história de intercurso sexual anal, não estariam incluídas no rastreamento do CA proposto pelo Ministério da Saúde para mulheres soropositivas para HIV, que recomenda exames de Papanicolau anuais para mulheres com história de sexo anal receptivo, infecção pelo HPV ou histologia cervical ou vulvar anormal (BRASIL, 2013).

Nossos resultados revelaram ainda que a presença de HPV cervical pode ser considerada um fator associado à infecção anal por HPV (OR= 2,2). Outros estudos, avaliando infecção concomitante por HPV cervical e anal, entretanto em mulheres HIV negativas, também demonstraram que mulheres com infecção por HPV cervical possuem um risco maior de aquisição de HPV anal em relação àquelas negativas para HPV cervical (HERNANDEZ et al., 2006; GOODMAN et al., 2008; 2011; GULLER et al., 2013). A possibilidade de o colo do útero atuar como uma fonte de infecção anal por HPV é reforçada pela observação de que a secreção vaginal pode ser encontrada no períneo e hábitos de higiene podem facilitar a transmissão para o ânus (MOSCIKI et al., 2012). No presente estudo, em mais de um terço dos casos positivos (38,9%) o HPV esteve presente em ambos os sítios. Frequência semelhante foi encontrada por Hessol et al. (2013), que detectaram uma taxa de 42% de infecção concomitante cervical e anal em mulheres soropositivas para HIV. Além de um sítio poder servir de reservatório para outro, a infecção concomitante por HPV em diferentes sítios anogenitais é considerado um fator de risco para a ocorrência simultânea de lesões anais e cervicais (HOLLY et al., 2001; MELBYE et al., 1996).

Neste estudo foi significativa a presença de HPV em sítio anal em mulheres com idade menor que 35 anos, o que está em consonância com resultados obtidos por Palefsky et al. (2001). Outros estudos têm relatado maior prevalência de HPV anal em mulheres ainda mais jovens (<30 anos), coincidindo com o início da atividade sexual (HERNANDEZ et al., 2006; 2013). Além disso, fatores relacionados à infecção pelo HIV, como contagens mais baixas de CD4 (<500 células/mm³) e carga viral detectável (>50 cópias/célula), também estiveram estatisticamente associados com a presença de HPV na região anal, como relatado anteriormente (CAMBOU et al., 2015; HOLLY

et al., 2001). Conforme sugerido por Gonçalves et al., (2008), a imunossupressão poderia facilitar a infecção pelo HPV e talvez sua persistência na região anal.

As técnicas de RLB e RFLP foram utilizadas neste estudo para determinar os tipos de HPV mucosos (*Alphapapillomavirus*), a partir do fragmento de 450 pb obtido na reação de PCR. Enquanto a metodologia de RLB detecta 32 tipos distintos, na RFLP pode-se detectar 44 tipos anogenitais, porém com a limitação na determinação dos tipos quando em infecção mista devido a um grande número de fragmentos gerados pelas enzimas de restrição. Neste estudo, foi possível identificar os genótipos presentes através da RLB na maioria das amostras positivas para HPV (84,4%). Como esta metodologia não é capaz de identificar todos os tipos mucosos, a associação com a RFLP permitiria, portanto, a identificação dos demais genótipos não contemplados pela RLB. Assim, RFLP identificou a maior parte (11/14) dos genótipos não identificados pela RLB, inclusive tipos cujas sondas estão presentes nessa metodologia (HPV26, 52 e 82). É possível que nestes casos a quantidade de DNA possa ter sido insuficiente para hibridização com as sondas. Os demais tipos não identificados pela RFLP (n=3) geraram um padrão de fragmentos atípicos e foram submetidos ao sequenciamento gênico que identificou os tipos mucosos 62 e 74 e o cutâneo 107. De fato, não existe um padrão de fragmentos determinado para os tipos HPV74 e 107. Em relação ao HPV62, a seqüência apresentou cinco trocas nucleotídicas quando comparada à seqüência de referência do HPV62 (GenBank: AY395706) (FU et al., 2004), que poderiam, portanto, ter interferido com a digestão do DNA pelas enzimas de restrição na RFLP. Portanto, a utilização dessas metodologias possibilitou genotipar todas as amostras do estudo, e uma grande variedade de tipos de HPV foi observada nas amostras, com 34 tipos distintos considerando ambos os sítios. Outros estudos avaliando tipos de HPV cervical e anal em mulheres soropositivas para HIV, também revelaram uma grande diversidade de tipos. No Brasil, Gonçalves et al. (2008), utilizando RFLP como método de tipagem encontraram 23 tipos distintos e Kojic et al. (2011), nos Estados Unidos, detectaram 37 tipos, pesquisados através de *Linear Array*. Em estudos com mulheres soronegativas para HIV, a quantidade de genótipos encontrados variou de 19-35, identificados através de *Linear Array*[®] ou *PapilloCheck*[®] como metodologias de tipagem (HERNANDEZ et al., 2006, 2013; GULER et al., 2013).

A presença do tipo cutâneo HPV107 em região anal, evidenciado pela técnica de sequenciamento gênico, não causa estranheza pois ele pertence ao gênero *Betapapillomavirus* que inclui tipos que normalmente infectam o epitélio cutâneo mas também são amplamente distribuídos, sendo detectados na pele saudável, no epitélio da mucosa oral e nasal além de lesões genitais externas como nas neoplasias intraepiteliais peniana (NIPs) (BOTTALICO et al., 2011; FORSLUND et al., 2013; FOULONGNE et al., 2012; PIERCE CAMPBELL et al., 2013; SICHERO et al., 2013). De fato, a presença de tipos cutâneos na região anal pode ocorrer através da transmissão durante o contato sexual (ASGARI et al., 2008; PIERCE CAMPBELL et al., 2013; WIELAND et al., 2000). Torres et al. (2015) encontraram alta prevalência de HPVs cutâneos (β e γ -*papillomavirus*) no canal anal de HSH soropositivos para HIV, estando o tipo 107 entre os mais prevalentes.

Os HR-HPV foram frequentes em espécimes cervicais de mulheres sem lesão cervical pela citologia (83,7%). Condizente com nossos resultados, Cerqueira et al., (2007), encontrou altas prevalências de HR-HPV (70,3%) em mulheres HIV positivas, cujos resultados citológicos cervicais eram majoritariamente normais (81,3%). O que torna essas informações mais relevantes é o fato de que o risco de desenvolvimento de uma lesão pré-câncer (NIC2+) em cinco anos foi estimada ser de 22% em mulheres com um resultado citológico normal e soropositivas para HIV e com teste também positivo para HR-HPV (KELLER et al.; 2015). Assim como na região cervical, HR-HPV também foi frequentemente encontrado na região anal das mulheres deste estudo (77,6%), consistente com outros estudos documentando a alta prevalência de HR-HPV em sítios anogenitais de mulheres soropositivas para HIV (GONÇALVES et al., 2008; KOJIC et al., 2011; HESSOL et al., 2013, CAMBOU et al., 2015). Estas informações destacam a importância da detecção e genotipagem do HPV na região anogenital dessa população, já que infecção persistente com HR-HPVs está relacionada ao desenvolvimento de lesões de alto grau e câncer, principalmente em indivíduos soropositivos para HIV (CAMBOU et al., 2015; ZBAR et al., 2002).

Dentre os HR-HPV, o HPV16 foi o tipo mais prevalente em nosso estudo tanto no colo uterino (8,9%) quanto na região anal (17,8%). Este tipo é o mais frequentemente associado ao CCU e ao CA (CASTELLSAGUE, 2008; HOOTS et al., 2009; HPV CENTRE, 2014; ZUR HAUSEN, 1996). Um estudo recente revelou que o risco de desenvolvimento de NIC2+ em três anos é de 29% para mulheres HIV positivas com

citologia cervical normal e positivas para HPV16 (KELLER et al., 2015). Ainda, essas mulheres possuem um risco 13 vezes maior de desenvolverem NIC3+ do que aquelas não infectadas por HR-HPV (KELLER et al., 2015). Clifford et al., (2006), também encontraram o HPV16 como o tipo mais prevalente em mulheres soropositivas para HIV e com citologia cervical negativa (12,4%). Outros estudos avaliando infecção concomitante por HPV em mulheres infectadas por HIV, também detectaram o HPV16 como o tipo mais prevalente no colo do útero (GONÇALVES et al., 2008; KOJIC et al., 2011), na região anal (HESSOL et al., 2013) ou em ambos os sítios (SEHNAL et al., 2014). A distribuição dos demais genótipos de HPV cervical e anal variou de acordo com o estudo, ilustrando a diversidade de genótipos de HPV encontrada de acordo com a região geográfica (BRUNI et al., 2010). Deve ser levada ainda em consideração neste caso, a técnica de genotipagem usada, visto que algumas metodologias apresentam sensibilidade variada e outras, se restringem à detecção de um número mais limitado de tipos (EIDE & DEBAQUE, 2012).

Este estudo caracterizou as variantes de HPV16 presentes na região cervical e anal e demonstrou maior prevalência das variantes europeias na população estudada (70,8%) em relação as não europeias (29,2%), o mesmo observado por outros estudos no Brasil (CRUZ et al., 2004; FREITAS et al., 2014; SICHERO et al., 2007; TAMEGÃO-LOPES et al., 2014). A determinação das variantes foi realizada utilizando iniciadores que amplificam 360 pb da região *LCR* que possui o segmento mais variável do genoma do HPV16 (CHEN et al., 2015). Mutações individuais dentro desta região podem afetar a transcrição de oncogenes virais, resultando em diferenças de potencial oncogênico do vírus (HUBERT et al., 2005). Vários trabalhos, baseados principalmente no sequenciamento da região *LCR* ou de *E6*, tem sugerido um risco aumentado de desenvolvimento de lesão de alto grau e câncer observado em variantes não europeias (BURK et al., 2013; CHANG et al., 2013; FREITAS et al., 2014; KRENNHRUBEC et al., 2011; MENDOZA e al., 2013; PIENTONG et al., 2012; SCHIFFMAN et al., 2010; SICHERO et al., 2012). Deste modo, o fato de a maioria das variantes de HPV16 encontradas neste estudo pertencerem à linhagem Europeia sugere um risco reduzido no desenvolvimento de lesões de alto grau, relacionadas ao HPV16 nessa população. Entretanto, é importante ressaltar que todas as variantes de HPV16 podem estar relacionadas com o desenvolvimento de pré-câncer e câncer, apesar do maior potencial oncogênico das variantes não europeias.

Duas variantes não-europeias foram caracterizadas sendo uma Africana 2a (6/7) e outra Asiático-americana 1 (1/7). Freitas et al. (2014) também encontraram a variante Africana 2 como a segunda mais comum em seu estudo com mulheres da região metropolitana de Vitória. Entretanto, outros trabalhos realizados na região Sudeste e também Centro-Oeste do Brasil encontraram a variante Asiático-americana como a segunda mais prevalente (CRUZ et al, 2004; SICHERO et al., 2007). Na realidade, a diferença na distribuição das variantes HPV16 pode variar de acordo com a área geográfica e se correlacionar com o nível de mistura intrínseca de cada população e padrões recentes de migração humana (CHEN et al., 2011; CORNET et al., 2013; SICHERO & VILLA, 2006). Curiosamente, as variantes não europeias foram encontradas mais frequentemente nas amostras anais das mulheres deste estudo, sugerindo um maior risco de desenvolvimento de lesões de alto grau nesse sítio. Entretanto, a escassez de trabalhos na literatura mundial relatando a distribuição de variantes de HPV16 nos sítios cervical e anal de mulheres limita a discussão mais aprofundada em relação a esse resultado.

Neste estudo, infecção com múltiplos tipos de HPV foi um achado comum nas amostras de ambos os sítios anatômicos, que apresentaram até sete tipos distintos, assim como relatado anteriormente em outros estudos (GONÇALVES et al., 1999; PALEFSKY et al., 1999; ELLERBROCK et al., 2000). Infecção por múltiplos tipos de HPV pode ser uma ocorrência comum em mulheres positivas para HIV (DENNY et al., 2008). Em nosso estudo, a maior parte (75%) das mulheres com contagem de CD4 menor que 500 células/mm³, apresentaram pelo menos dois tipos distintos de HPV, considerando os sítios cervical e/ou anal, apesar de não ter sido estatisticamente significativa. Uma hipótese seria devido ao menor *clearance* da infecção observada em mulheres infectadas pelo HIV, atribuído principalmente à sua função imunológica comprometida (AHDIEH et al., 2000). Podemos considerar que a exposição de uma mulher soropositiva para HIV a uma nova infecção por HPV ou ainda, a reativação de uma infecção latente, pode resultar em acúmulo de diferentes genótipos deste vírus e a uma consequente maior prevalência de mulheres com infecções múltiplas. Além disso, infecção múltipla, com pelo menos três tipos distintos de HPV, foram mais comuns nas amostras anais (78,6%) do que nas cervicais (21,4%) (OR= 2,9). Não se sabe se a presença de múltiplos tipos de HPV poderia aumentar a patogênese de lesões intra-epiteliais, entretanto, Palefsky et al. (2001) sugerem que infecções

múltiplas por HPV na região anal podem acelerar o desenvolvimento de lesões nesse sítio ou ainda, aumentar o risco de uma infecção subsequente em locais anatômicos adjacentes, como na região cérvico-vaginal.

Dentre os casos de infecção concomitante entre os sítios, quando pelo menos um tipo de HPV era concordante (48,6%), a maioria das vezes foi encontrado HR-HPV (76,5%) e em outros estudos, essa prevalência variou de 18%-68,6% em mulheres infectadas pelo HIV (GONÇALVES et al., 2008; KOJIC et al., 2011, HESSOL et al., 2013) e de 53-58,3% em mulheres não infectadas pelo HIV (HERNANDEZ et al., 2006; GULER et al., 2013). Portanto a concordância entre genótipos, principalmente HR-HPV, sugere que um sítio pode ser fonte de infecção para o outro, como anteriormente comentado, aumentando o risco de infecção persistente (devido a frequente reexposição) e o desenvolvimento de lesões pré-câncer, principalmente em mulheres HIV positivas.

Além de fornecer informações quanto ao perfil epidemiológico das infecções por HPV em mulheres com citologia negativa e soropositivas para HIV, a determinação dos tipos de HPV fornece dados para o monitoramento de eficácia das vacinas atualmente licenciadas (HARPER et al., 2006; VILLA et al., 2006; SERRANO et al., 2012). Neste sentido, dentre os HR-HPVs encontrados nas mulheres deste estudo e preveníveis pela vacina quadrivalente, grande parte da população estudada se beneficiaria com a vacinação, principalmente com relação ao desenvolvimento do CCU, CA e lesões benignas na região anal visto que o HPV16 foi o de maior prevalência, enquanto que dentre os LR-HPV, destacou-se a alta prevalência dos tipos 6 e 11 na região anal. Este fato tornou-se ainda mais relevante após a implementação da vacina quadrivalente pelo Programa Nacional de Imunizações (PNI) no Brasil, em que mulheres de 9 a 26 vivendo com HIV passaram a fazer parte da população alvo para vacinação a partir de 2015 (BRASIL, 2015).

Atualmente, mudanças significativas têm ocorrido em relação ao rastreio do CCU, na população em geral, como a implementação do co-teste em países como nos Estados Unidos, que consiste na detecção de HR-HPV juntamente com o Papanicolaou. Além disso, o FDA aprovou recentemente o teste Cobas® HPV test (Roche Molecular Diagnostics), que detecta 14 tipos de HR-HPV e fornece informações de genotipagem dos tipos 16 e 18, como uma alternativa ao Papanicolaou no rastreio primário do CCU (FDA, 2014).

Vários trabalhos na literatura vêm enfatizando a importância da implementação do diagnóstico molecular na rotina de rastreio do CCU, em associação ao exame citológico de Papanicolaou (co-teste), na população em geral (CASTLE et al., 2002; COX & CUZICK, 2006; ZOA ASSOUMOU et al., 2016) e em mulheres soropositivas para HIV (KELLER et al., 2015; MUSA et al., 2014), inclusive em países como o Brasil (VANNI et al., 2012). No geral, os dados atuais sugerem que as mulheres infectadas pelo HIV podem se beneficiar do co-teste, permitindo assim um maior intervalo no rastreio a partir de um resultado negativo (citologia normal e HR-HPV negativo) e um melhor monitoramento dessas mulheres frente a um resultado de citologia normal e HR-HPV positivo, com repetição do co-teste após um ano, e colposcopia imediata para aquelas positivas para HPV16, conforme previamente sugerido (KELLER et al., 2015; SASLOW et al., 2012).

Neste estudo, uma alta percentagem das mulheres soropositivas para HIV atendidas no CR-DST/AIDS, Vitória-ES, que aceitaram participar deste estudo, obtiveram resultado citológico cervical normal (94,7%). Este fato merece atenção, principalmente em relação à qualidade e confiabilidade dos exames realizados, visto que outros estudos do Brasil, com mulheres também soropositivas para HIV, mostraram uma variação entre 44,8-92,7% de resultados citológicos cervicais normais (ARAÚJO et al., 2012; ENTIAUSPE et al., 2010; LIMA et al., 2014; MELGAÇO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2010; ROCHA-BRISCHILIARI et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2012). É importante salientar que embora o rastreio do CCU, com diferentes faixas etárias e a periodicidade dos testes, seja recomendado na maioria dos países, sua incidência e mortalidade ainda é grande nos países em desenvolvimento devido a limitações metodológicas da citologia e/ou cobertura de triagem (KITCHENER et al., 2006; WHO, 2010). Além disso, mulheres positivas para HIV apresentam um risco maior de desenvolverem infecção persistente, que por outro lado, podem se manter assintomáticas por período indeterminado não sendo observadas pelo Papanicolaou. Por tudo que foi apresentado, este trabalho demonstra a importância da utilização de técnicas moleculares de identificação e genotipagem do HPV de mulheres soropositivas para HIV como método primário de triagem. Portanto, este estudo contribui para que novas políticas de rastreio possam ser implementadas para o melhor monitoramento dessa população de risco.

7 CONCLUSÕES

- Este estudo revelou alta prevalência de HPV, mais frequentemente detectado na região anal do que na cervical;
- HPV16 foi o tipo mais prevalente em ambos os sítios pesquisados, com predomínio da variante europeia;
- Infecção com múltiplos tipos de HPV foi um achado comum na população de estudo, corroborando com dados da literatura mundial;
- Mais de dois terços das mulheres positivas para HPV estavam concomitantemente infectadas na região cervical e anal. Destas, em quase metade dos casos foi encontrado um genótipo concordante, demonstrando que a transmissão entre os dois sítios pode ocorrer;
- Presença de HPV cervical, idade menor que 35 anos, baixa contagem de células CD4 e carga viral detectável do HIV foram fatores associados à presença de HPV anal.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. L. et al. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. **Virology journal**, v. 9, n. 1, p. 262, 2012.
- AHDIEH, L. et al. Cervical neoplasia and repeated positivity of human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-seropositive and -seronegative women. **American Journal of Epidemiology**, v. 151, p. 1148–1157, 2000.
- AHDIEH, L. et al. Prevalence, incidence, and type-specific persistence of human papillomavirus in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative women. **The Journal of Infectious Disease**, v. 184, p. 682–690, 2001.
- ALEXANDER, M. et al. 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. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 175, p. 1586- 1593, 1996.
- ARAUJO, A. C. L. et al. Incidence of cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of HIV- infected women. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 117, p. 211-6, 2012.
- ASATO, T. et al. A large case-control study of cervical cancer risk associated with human papillomavirus infection in Japan, by nucleotide sequencing based genotyping. **The Journal of Infectious Disease**, v. 189, p. 1829-1832, 2004.
- ASGARI, M. M. et al., Detection of human papillomavirus DNA in cutaneous squamous cell carcinoma among immunocompetent individuals. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 6, p 1409–1417, 2008.
- BENNETT, M.D. et al. The first complete papillomavirus genome characterized from a marsupial host: a novel isolate from from *Bettongia penicillata*. **Journal of Virology**, v. 84, p.5448–5453, 2010.
- BERNARD, H.U. et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. **Infectious Diseases Journal**, v. 170, n. 5, p.1077-1085, 1994.
- BERNARD, H, U.; CALLEJA-MACIAS, I. E.; DUNN, S. T. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. **International Journal of Cancer**, v. 118, p. 1071–6, 2005.
- BERNARD, H.U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70-9, 2010.
- BEZERRA, S. J. S. et al. Perfil de mulheres portadoras de lesões cervicais por HPV quanto aos fatores de risco para câncer de colo uterino. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Fortaleza, v. 17, n. 2, p. 143-148, 2005.
- BOSCH, F. M. et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **Journal of Clinical Pathology**, Barcelona, v. 55, n. 4 p. 244-65, 2002.
- BOTTALICO, D. et al. The oral cavity contains abundant known and novel human papillomaviruses from the Betapapillomavirus and Gammapapillomavirus genera. **Journal of Infectious Disease**, v. 204, n. 5, p. 787–792, 2011.

BOUSARGHIN L. et al. Human papilloma- virus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. **Journal of Virology**, v. 77, p. 3846-50, 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapeuticas Para Adultos Vivendo Com HIV/AIDS. Brasília, 2013.

BRASIL, Portal Brasil, 2014. Disponível em <<http://www.brasil.gov.br/saude/2014/03/vacinacao-contrahpv-comeca-nesta-segunda-feira-10>> Acesso: 8 ago. 2015.

BRASIL, Portal Brasil, 2015. Disponível em <<http://www.brasil.gov.br/saude/2015/03/mulheres-com-virus-da-aids-podem-ser-vacinadas-contrahpv>> Acesso: 11 ago. 2015.

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

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

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

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

CAMBOU, M. C. et al. Anal human papillomavirus (HPV) prevalences and factors associated with abnormal anal cytology in HIV-infected women in an urban cohort from Rio de Janeiro, Brazil. **AIDS patient care and STDs**, v. 29, n. 1, p. 4–12, 2015.

CASTLE, P. E. et al. Absolute risk of a subsequent abnormal pap among oncogenic human papillomavirus DNA-positive, cytologically negative women. **Cancer**, v. 95, n. 10, p. 2145–51, 2002.

CASTLE, P. E. et al. Restricted cross-reactivity of Hybrid Capture 2 with nononcogenic human papillomavirus types. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Maryland, v. 11, n.11, p.1394–9, 2002.

CASTELLSAGUE, X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 110, S4-S7, 2008.

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

CENTURIONI, M. G. et al. Prevalence of human papillomavirus cervical infection in an Italian asymptomatic population. **BMC infectious diseases**, v. 5, p. 77, 2005.

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

CHANG, Y. J. et al. Intratypic variants of human papillomavirus type 16 and risk of cervical neoplasia in Taiwan. **Journal of Medical Virology**, v. 85, p. 1567–1576, 2013.

- CHEN, Z. et al. Evolution and Taxonomic Classification of Human Papillomavirus 16 (HPV16)-Related Variant Genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. **Plos One**, v. 6, e20183, 2011.
- CHEN, Z.; FREITAS, L. B.; BURK, R. D. Evolution and classification of oncogenic human papillomavirus types and variants associated with cervical cancer. **Methods in molecular biology**, v. 1249, p. 3-26, 2015.
- CHIASSON, M. A. et al. Increased prevalence of vulvovaginal condyloma and vulvar intraepithelial neoplasia in women infected with the human immunodeficiency virus. **Obstetrics & Gynecology**, v. 89, p. 690-694, 1997.
- CHO, Y. S. et al. Down modulation of IL-18 expression by human papillomavirus type 16 E6 oncogene via binding to IL-18. **FEBS Letters**, v.501, p. 139-145, 2001.
- CLIFFORD, G. M. et al. Human papillomavirus types among women infected with HIV: a meta-analysis. **AIDS**, v. 20, n. 18, p. 2337–44, 2006.
- COMBITA, A. L. et al. Gene transfer using human papillomavirus pseudovirions varies according to virus genotype and requires cell surface heparan sulfate. **FEMS Microbiology Letters**, v. 204, n. 1, p. 183–8. 2001.
- COPE, J. U. et al. Comparison of the Hybrid Capture tube test and PCR for detection of human papillomavirus DNA in cervical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Maryland, v. 35, n. 9, p. 2262–5, 1997
- CORNET, I. et al. HPV16 genetic variation and the development of cervical cancer worldwide. **British journal of cancer**, v. 108, n. 1, p. 240–4, 2013.
- COX, T.; CUZICK, J. HPV DNA testing in cervical cancer screening: From evidence to policies. **Gynecologic Oncology**, v. 103, p. 8–11, 2006.
- CRUZ, M. R. et al. Prevalence of human papillomavirus type 16 variants in the Federal District, Central Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 281–2, 2004.
- CULP, T. D.; CHRISTENSEN, N. D. Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions. **Virology**, v. 319, n. 1, p.152-61, 2004.
- CUZICK, J. et al. Overview of Human Papillomavirus-Based and Other Novel Options for Cervical Cancer Screening in Developed and Developing Countries. **Vaccine**, v. 26, p. K29–K41, 2008.
- DALING, J. R. et al. Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. **Cancer**, v. 101, n. 2, p. 270– 280, 2004.
- DAY, P.M.; LOWY, D.R; SCHILLER, J.T. Papillomaviruses infect cells via a clathrin dependent pathway. **Virology**, v. 307, n. 1, p.1-11, 2003.
- DE JONG, A. et al. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. **Cancer Research**, v. 64, n. 15, p. 5449–55, 2004.
- DE MARTEL, C. et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: A review and synthetic analysis. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 6, p. 607–615, 2012.

- DE RODA HUSMAN, A. M. et al. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. **The Journal of General Virology**, v. 76, p. 1057-62, 1995.
- DE VILLIERS, E.M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p.17-27, 2004.
- DE VUYST, H. et al. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 7, p. 1626–36, 2009.
- DENNY, L. A.; WRIGHT, T. C. Human papillomavirus testing and screening. **Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology**, Cape Town, v. 19, n. 4, p. 501–15, 2005.
- DENNY, L. et al. Human papillomavirus infection and cervical disease in human immunodeficiency virus-1 infected women. **Obstetrics & Gynecology**, v. 111, n. 6, p. 1380–7, 2008.
- DENNY, L. A. et al. Human papillomavirus, human immunodeficiency virus and immunosuppression. **Vaccine**, v. 30, n. SUPPL.5, p. F168–F174, 2012.
- DILLNER, J. The serological response to papillomaviruses. **Seminars in Cancer Biology**, v. 9, p. 423-430, 1999.
- DIMAIO D.; LIAO, J. B: Human papillomaviruses and cervical cancer. **Advances in Virus Research**, v. 66, p.125-140, 2006.
- DING, D. C. et al. Methylation of the long control region of HPV16 is related to the severity of cervical neoplasia. **The European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 147, n. 2, p. 215–20, 2009.
- DOORBAR, J. et al. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. **Nature**, v. 352, p. 824–7, 1991.
- DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical Science**, London, v. 110, n. 5, p. 525-41, 2006.
- DOORBAR, J. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30, SUPPL.5, 2012.
- DUERR, A. et al. Human papillomavirus-associated cervical cytologic abnormalities among women with or at risk of infection with human immunodeficiency virus. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 184, p. 584–590, 2001.
- EIDE, M. L.; DEBAQUE, H. HPV detection methods and genotyping techniques in screening for cervical cancer. **Annales de pathologie**, v.32, n. 6, p. 401-9, 2012.
- EINSTEIN, M. H. et al. Clinician's guide to human papillomavirus immunology: knowns and unknowns. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 6, p. 347–356, 2009.
- ELLERBROCK, T. V. et al. Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women. **JAMA**, v. 283, p. 1031-1037, 2000.

ENTIAUSPE, L. G. et al. Papilomavirus humano: prevalencia e genotipos encontrados em mulheres HIV positivas e negativas, em um centro de referencia no extremo Sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 260-3, 2010.

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

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

EVANS, C. et al. HLA-A2-restricted peripheral blood cytolytic T lymphocyte response to HPV type 16 proteins E6 and E7 from patients with neoplastic cervical lesions. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 42, p. 151-160, 1996.

EVANS, E. M. et al. Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. **Cancer Research**, v. 57, p. 2943-2950, 1997.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Gardasil Vaccine Safety, Information from FDA And CDC on the Safety of Gardasil Vaccine. 2009. Disponível em: <<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/VaccineSafety/ucm179549.htm>> Acesso julho de 2015.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA approves first human papillomavirus test for primary cervical cancer screening. Disponível em: <<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm39477.htm>>. Acesso em 30 set. 2015.

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

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

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

FORMAN, D. et al. Global burden of human papillomavirus and related diseases. **Vaccine**, v. 30, suppl 5, F12– 23, 2012.

FORSLUND, O. et al. The nasal mucosa contains a large spectrum of human papillomavirus types from the Betapapillomavirus and Gammapapillomavirus genera. **Journal of Infectious Disease**, v. 208, n. 8, p. 1335–1341, 2013.

FOULONGNE, V. et al. Human skin microbiota: high diversity of DNA viruses identified on the human skin by high throughput sequencing. **PLoS One**, v. 7, n 6, e38499, 2012.

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

- FRISCH, M.; BIGGAR, R. J.; GOEDERT, J. J. Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 18, p. 1500-1510, 2000.
- FU, L. et al. Codetection of a Mixed Population of candHPV62 Containing Wild-Type and Disrupted E1 Open-Reading Frame in a 45-Year-Old Woman with Normal Cytology. **The Journal of Infectious Disease**, v. 190, n. 7, p. 1303-1309, 2004.
- GAMBHIRA, R. et al. A protective and broadly cross-neutralizing epitope of Human Papillomavirus L2. **Journal of Virology**, v. 81, p. 13927–13931, 2007.
- GAMBHIRA, R. et al. Role of L2 cysteines in papillomavirus infection and neutralization. **Virology Journal**, v. 6, p.176, 2009.
- GARIGLIO, P. et al. The role of retinoid deficiency and estrogens as cofactors in cervical cancer. **Archives of Medical Research**, v. 40, n. 6, p. 449–65, 2009.
- GAUKROGER, J. M. et al. Vaccination of cattle with bovine papillomavirus type 4 L2 elicits the production of virus-neutralizing antibodies. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 1577–1583, 1996.
- GENTHER, S. M. et al. Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle. **Journal of Virology**, v. 77, p. 2832–42, 2003.
- GIROGLOU, T. et al. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. **Journal of Virology**, Mainz, v. 75, n. 3, p. 1565-70, 2001.
- GIULIANO, A. R. et al. EUROGIN 2014 roadmap: Differences in human papillomavirus infection natural history, transmission and human papillomavirus-related cancer incidence by gender and anatomic site of infection. **International journal of cancer**, v. 136, n. 12, p. 2752-60, 2014.
- GONÇALVES, M. A. G. et al. Relationship between human papillomavirus (HPV) genotyping and genital neoplasia in HIV-positive patients of Santos city, São Paulo, Brazil. **International Journal of DST & AIDS**, v. 10, p. 803-807, 1999.
- GONÇALVES, M. A. G. et al. HPV type infection in different anogenital sites among HIV-positive Brazilian women. **Infectious agents and cancer**, v. 3, p. 5, 2008.
- GOODMAN, M. T. et al. Acquisition of Anal Human Papillomavirus (HPV) Infection in Women: the Hawaii HPV Cohort Study. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 7, p. 957–966, 2008.
- GOUY, M.; GUINDON, S.; GASCUEL, O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 2, p. 221-224, 2010.
- GRAVITT, P. E. et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, California, v. 38, p.357-61, 2000.
- GULER, T. et al. Coexisting anal human papilloma virus infection in heterosexual women with cervical HPV infection. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 288, n. 3, p. 667–72, 2013.

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

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

HARPER, D. M. 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**, Lebanon, v. 367, n. 9518, p. 1247–1255, 2006.

HERBST, L. H. et al. Genomic characterization of two novel reptilian papillomaviruses, *Chelonia mydas* papillomavirus 1 and *Caretta caretta* papillomavirus 1. **Virology**, v. 383, p. 131–135, 2009.

HERNANDEZ, B. Y.; MCDUFFIE, K.; ZHU, X. Relationship with Cervical Infection. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 14, p. 2550–2556, 2006.

HERNANDEZ, B. Y. et al. Cervical and anal human papillomavirus infection in adult women in American Samoa. **Asia-Pacific journal of public health / Asia-Pacific Academic Consortium for Public Health**, v. 25, n. 1, p. 19–31, 2013.

HESSOL, N. A et al. Concomitant anal and cervical human papillomavirusV infections and intraepithelial neoplasia in HIV-infected and uninfected women. **AIDS (London, England)**, v. 27, n. 11, p. 1743–51, 2013.

HILLER, T. et al. Comparative analysis of 19 genital human papillomavirus types with regard to p53 degradation, immortalization, phylogeny, and epidemiologic risk classification. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 15, p. 1262–1267, 2006.

HOORY, T. et al. Molecular epidemiology of human papillomavirus. **Journal of the Formosan Medical Association**; v. 107, n. 3, p. 198-217, 2008.

HOOTS, B. E. et al. Human papillomavirus type distribution in anal cancer and anal intraepithelial lesions. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 10, p. 2375–83, 2009.

HOWLEY, P. M.; LOWY, D. R. PAPILOMAVIRUSES. 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.

HPV CENTER - International Human Papillomavirus Reference Center. Disponível em ><http://www.hpvcenter.se/html/refclones.html>> Acesso em 19 fev 2016.

HPV CENTRE. Human Papillomavirus and Related Diseases Report. 2014.

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

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

HUBERT, W. G. Variant upstream regulatory region sequences differentially regulate human papillomavirus type 16 DNA replication throughout the viral life. **Journal of Virology**, v. 79, p. 5914–22, 2005.

IARC. INTERNATIONAL AGENCY ON CANCER. Efficacy of screening. IARC Handbooks of Cancer Prevention. Volume 10: Cervix Cancer Screening, p. 117–162, 2005.

IARC. INTERNATIONAL AGENCY ON CANCER. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 90: Human Papillomaviruses. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2007.

IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. A Review of Human Carcinogens: Biological Agents. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, v. 100, n. B, p. 255–296, 2012.

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses. Virua Taxonomy: 2011 Release. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>> Acesso em: 19 fev 2016.

IFTNER, T.; VILLA, L.L. Chapter 12: Human papillomavirus technologies. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, n. 31, p. 80-88, 2003.

INCA – Instituto Nacional de Câncer. Nomenclatura brasileira para laudos cervicais e condutas preconizadas, 2012. Disponível em <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/nomenclatura_laudo_cervical.pdf> Acesso em 2 mar. 2016.

INCA – Instituto Nacional de Câncer. Controle do Câncer do Colo do Útero. Disponível em <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_nacional_controle_cancer_colo_uterio/deteccao_precoce> Acesso em 26 Jan 2016.

JAGU, S. et al. Concatenated multitype L2 fusion proteins as candidate prophylactic pan-human papillomavirus vaccines. **The Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, p. 782–792, 2009.

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

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

JIMÉNEZ, W. et al. Presumed previous human papillomavirus (HPV) related gynecological cancer in women diagnosed with anal cancer in the province of Ontario. **Gynecologic Oncology** v, 114, n. 3, p. 395–398, 2009.

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

KANODIA, S.; FAHEY, L. M.; KAST, W. M. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. **Current Cancer Drug Targets**, v.7, n. 1, p. 79–89, 2007.

KELLER, M. J. et al. Cervical Precancer Risk in HIV-Infected Women Who Test Positive for Oncogenic Human Papillomavirus Despite a Normal Pap Test. **Clinical Infectious Diseases**, p. civ569, 2015.

KINGSMORE, S. F.; SAUNDERS, C. J. Deep sequencing of patient genomes for disease diagnosis: when will it become routine? **Science Translational Medicine**, v. 87, 87ps23, 2011.

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

KITCHENER, H. C.; CASTLE, P. E.; COX, J. T. Chapter 7: Achievements and limitations of cervical cytology screening. **Vaccine**, v. 24 Suppl 3, p. S3/63–70, 31, 2006.

KLETER, B. et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 8, p. 2508–17, 1999.

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

KOJIC, E. M. et al. Human papillomavirus infection and cytologic abnormalities of the anus and cervix among HIV-infected women in the study to understand the natural history of HIV/AIDS in the era of effective therapy (the SUN study). **Sexually transmitted diseases**, v. 38, n. 4, p. 253–9, 2011.

KOSHIOL, J. E. et al. Time to clearance of human papillomavirus infection by type and human immunodeficiency virus serostatus. **International Journal of Cancer**, v. 119, n. 7, p. 1623–9, 2006.

KOUTSKY, L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. **The American journal of medicine**, v. 102, p. 3-8, 1997.

KRENNHRUBEC, K. al. HPV types and variants among cervical cancer tumors in three regions of Tunisia. **Journal of Medical Virology**, v. 83, p. 651–657, 2011.

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

LEE, S. J. et al. Both E6 and E7 oncoproteins of human papillomavirus 16 inhibit IL-18-induced IFN-gamma production in human peripheral blood mononuclear and NK cells. **The Journal of Immunology**, v. 167, p. 497-504, 2001.

LEE, G. Y. et al. Human papillomavirus (HPV) genotyping by HPV DNA chip in cervical cancer and precancerous lesions. **International Journal of Gynecological Cancer**, Dongku, v.15, p. 81-87, 2005.

LEE, S. H. et al. Routine human papillomavirus genotyping by DNA sequencing in community hospital laboratories. **Infectious Agents and Cancer**, v. 2, n. 11, 2007.

LEHR, E. et al. Infection with human papillomavirus alters expression of the small proline rich proteins 2 and 3. **Journal of Medical Virology**, v. 72, p. 478–83, 2004.

LETO, M. D. G. P. et al. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 86, n. 2, p. 306–317, 2011.

LEVI, J. E. et al. High presence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in Human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3341-3345, 2002.

LIMA, M. D. M. et al. Oral and cervical HPV infection in HIV-positive and HIV-negative women attending a sexual health clinic in Sao Paulo, Brazil. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 126, p. 33-6, 2014.

LINNARSSON, S. Recent advances in DNA sequencing methods – general principles of sample preparation. **Experimental Cell Research**, v. 316, p.1339–43, 2010.

LIZANO, M.; BERUMEN, J.; GARCIA-CARRANCA, A: HPV-related carcinogenesis: Basic concepts, viral types and variants. **Archives of Medical Research**, v. 40, p. 428-434, 2009.

LORINCZ, A. T. Hybrid Capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens: a tool for clinical management of equivocal Pap smears and for population screening. **The Journal of Obstetrics Gynaecology Research**, Silver Spring, v. 22, n. 6, p.629–36, 1996.

MAGLENNON, G. A.; MCINTOSH, P.; DOORBAR, J. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. **Virology**, v. 414, n. 2, p. 153–163, 2011.

MAIMAN, M. et al. Prevalence, risk factors, and accuracy of cytologic screening for cervical intraepithelial neoplasia in women with the human immunodeficiency virus. **Gynecology Oncology**, 68, p. 233-9, 1998.

MANOS, M. M. et al. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Cancer Cells**, v. 7, p. 209-214, 1989.

MCBRIDE, A. A. Replication and partitioning of papillomavirus genomes. **Advances in Virus Research**, v. 72, p. 155–205, 2008.

MCKENZIE, N.D. et al. Women with HIV are more commonly infected with non-16 and non-18 high-risk HPV types. **Gynecology Oncology**, v. 116, n. 3, p. 572-577, 2009.

MEIJER, C. J.; SNIJDERS, P. J.; CASTLE, P. E. Clinical utility of HPV genotyping. **Gynecologic Oncology**, v. 103, p. 12–17, 2006.

MELBYE, M; SPROGEL, P. A etiological parallel between anal cancer and cervical cancer. **The Lancet**, v. 338, p. 657–659, 1991.

MELBYE, M. et al. Anal and cervical abnormality in women: prediction by human papillomavirus tests. **International Journal of Cancer**, v. 68, p. 559–564, 1996.

MELCHERS, W. J. et al. Short fragment polymerase chain reaction reverse hybridization line probe assay to detect and genotype a broad-spectrum of human papillomavirus types: clinical evaluation and follow-up. **The American Journal of Pathology**, v. 155, n. 5, p.1473–8, 1999.

- MELGAÇO F. G. et al. Human papillomavirus genotypes distribution in cervical samples from women living with human immunodeficiency virus. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 283, p. 809-17, 2011.
- MELSHEIMER, P. et al. DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 e6/e7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 9, p. 3059–63, 2004.
- MENDOZA, L. et al. Distribution of HPV-16 variants among isolates from Paraguayan women with different grades of cervical lesion. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 122, p. 44–47, 2013.
- MIDDLETON, K. et al. Organisation of the human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for the selection of diagnostic markers. **Journal of Virology**, v. 77, p. 10186–201, 2003.
- MITRA, S.; CRANE, L. Diagnosis, Treatment, and Prevention of Anal Cancer. **Current Infectious Disease Reports**, v. 14, p. 61–66, 2012.
- MOLIJN, A. et al. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. **Journal of Clinical Virology**, Netherlands, V. 32 Suppl 1:S43-51, 2005.
- MOODY, C. A; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature reviews. Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550–60, 2010.
- MOSCICKI, A.-B. et al. Updating the natural history of human papillomavirus and anogenital cancers. **Vaccine**, v. 30 Suppl 5, p. F24–33, 2012.
- MUNGER, K. et al. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. **EMBO Journal**. v. 8, p. 4099–4105, 1989.
- MUNGER, K. et al. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. **Oncogene**, v. 20, p. 7888–98, 2001.
- MUÑOZ, N. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 518–527, 2003.
- MUÑOZ, N. et al. HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24, S1–S10, 2006.
- MUSA, J. et al. High-risk human papilloma virus and cervical abnormalities in HIV-infected women with normal cervical cytology. **Infectious agents and cancer**, v. 9, n. 1, p. 36, 2014.
- NAKAGAWA, M. et al. CD4-positive and CD8-positive cytotoxic T lymphocytes contribute to human papillomavirus type 16 E6 and E7 responses. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, p. 494-498, 1999.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE – NCI Visuals Online. Disponível em <<https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=2255>> Acesso em 7 fev 2016.
- NATIONAL REFERENCE LABORATORY FOR PAPILOMAVIRUSES. Diagnosis – Commercial kits. Disponível em <[http:// www.papillomavirus.cz/images/hybridcapture.jpg](http://www.papillomavirus.cz/images/hybridcapture.jpg)>. Acesso em 08 jul. 2015.

NAUCLER, P. et al. HPV type-specific risks of high-grade CIN during 4 years of follow-up: A population-based prospective study. **British Journal of Cancer**, v. 97, p. 129-32, 2007.

OLIVEIRA, P. M.; OLIVEIRA, R. P. C.; TRAVESSA, I. E. M. Prevalence and risk factors for cervical intraepithelial neoplasia in HIV-infected women in Salvador, Bahia, Brazil. **São Paulo medical journal**, v. 128, p. 197-201, 2010.

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

PALEFSKY, J. M. et al. High incidence of anal high-grade squamous intra-epithelial lesions among HIV-positive and HIV-negative homosexual and bisexual men. **Aids**, v. 12, p. 495–503, 1998.

PALEFSKY J. M., et al. Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, n. 3, p. 226–36, 1999.

PALEFSKY, J. M. et al. Prevalence and risk factors for anal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. **The Journal Infectious Disease**, v. 183, p. 383–91, 2001.

PALEFSKY, J. HPV and anal cancer. HPV today, 2010.

PANDE, S. et al. Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in biopsy samples from cervical cancer patients in North India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 1060–6, 2008.

PANNIER-STOCKMAN, C. et al. Prevalence of HPV genotypes determined by PCR and DNA sequencing in cervical specimens from French women with or without abnormalities. **Journal of Clinical Virology**, v. 42, p. 353–360, 2008.

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

PARK, I. U. et al. Anal human papillomavirus infection and abnormal anal cytology in women with genital neoplasia. **Gynecology Oncology**, v. 114, p. 399–403, 2009.

PASTRANA, D. V. et al. Cross-neutralization OF cutaneous and mucosal Papillomavirus types with anti-sera to the amino terminus of L2. **Virology**, v. 337, p. 365–372, 2005.

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

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

PIENTONG, C. et al. Association of human papillomavirus type 16 long control region mutation and cervical cancer. **Virology journal**, v. 10, n. 1, p. 30, 2013.

PIERCE CAMPBELL, C. M. et al. Cutaneous human papillomavirus types detected on the surface of male external genital lesions: a case series within the HPV infection in men study, **Journal of Clinical Virology**, v. 58, n. 4, p. 652–659, 2013.

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

POLJAK, M. et al. Hybrid Capture II HPV test detects at least 15 human papillomavirus genotypes not included in its current high-risk probe cocktail. **Journal of Clinical Virology**, Slovenia, v. 25, Suppl. 3S, p.89–97, 2002.

PROBER, J. M. et al. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. **Science**, v. 238, p. 336–41, 1987.

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

QIAGEN. QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook, fev. 2015. Disponível em <<https://www.qiagen.com/be/resources/resourcedetail?id=67893a91-946f-49b5-8033-394fa5d752ea&lang=en>>. Acesso em: 15 dez. 2015.

QUEIROZ, C. et al. Prevalence of Human Papilloma Virus in HIV-Positive and HIV-Negative Patients in the State of Bahia. A Pilot Study. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 8 n. 5, p. 356-362, 2004.

QUINT, W. G. V. et al. Comparative analysis of human papillomavirus infections in cervical scrapes and biopsy specimens by general SPF10 PCR and HPV genotyping. **The Journal of Pathology**, Delft, v. 194, n. 1, p. 154–8, 2001.

RICHART, R. M. Proceedings: an assessment of the biology of cervical intraepithelial neoplasia. **Proceedings of the National Cancer Conference**, v. 7, p. 219–22.

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

ROSE, R. C.; REICHMAN, R. C.; BONNEZ, W. Human papillomavirus (HPV) type 11 recombinant virus-like particles induce the formation of neutralizing antibodies and detect HPV-specific antibodies in human sera. **The Journal of General Virology**, New York, v. 75(Pt 8), p. 2075–9, 1994.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 74, p. 5463–7, 1977.

SAPP, M.; BIENKOWSKA-HABA, M. Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. **FEBS Journal**, v. 276, n. 24, p. 7206–7216, 2009.

SASLOW, D. et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, v. 16, p. 175–204, 2012.

SCHELLENBACHER, C.; RODEN, R.; KIRNBAUER, R. Chimeric L1-L2 virus-like particles as potential broad- spectrum human papillomavirus vaccines. **Journal Virology**, v. 83, p. 10085–10095, 2009.

SCHIFFMAN, M. H. Validation of hybridization assays: correlation of filter in situ, dot blot and PCR with Southern blot. **IARC Scientific Publications**, Bethesda, n. 119, p. 169-179, 1992.

SCHIFFMAN, M.; KJAER SK. Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, v. 31, p. 14–9, 2003.

SCHIFFMAN, M. et al. A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. **Cancer Research**, v. 70, n. 8, p. 3159–69, 2010.

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

SCHILLER, J. T.; MÜLLER, M. Next generation prophylactic human papillomavirus vaccines. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 5, p. e217–e225, 2015.

SEHNAL, B. et al. The relationship between the cervical and anal HPV infection in women with cervical intraepithelial neoplasia. **Journal of clinical virology**, v. 59, n. 1, p. 18–23, 2014.

SERRANO, B. et al. Potential impact of a nine-valent vaccine in human papillomavirus related cervical disease. **Infectious agents and cancer**. Barcelona, v. 7, n. 1, p. 38, 2012.

SHERMAN, L. et al. Inhibition of serum- and calcium-induced differentiation of human keratinocytes by HPV16 E6 oncoprotein: role of p53 inactivation. **Virology**, v. 237, p. 296–306, 1997.

SHIELDS, T. S. et al. A case-control study of risk factors for invasive cervical cancer among U.S. women exposed to oncogenic types of human papillomavirus. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 13, n. 10, p. 1574-82, 2004.

SHVETSOV, Y. B. et al. Duration and clearance of anal human papillomavirus (HPV) infection among women: the Hawaii HPV cohort study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 5, p. 536–46, 2009.

SICHERO, L.; VILLA, L. L. Epidemiological and functional implications of molecular variants of human papillomavirus. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 707–717, 2006.

SICHERO, L. et al. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. **International Journal of Cancer**, v. 120, n. 8, p. 1763–1768, 2007.

SICHERO, L.; SOBRINHO, J. S.; VILLA, L. L. Oncogenic potential diverge among human papillomavirus type 16 natural variants. **Virology**, v. 432, p. 127–132, 2012.

SICHERO, L. et al. Broad HPV distribution in the genital region of men from the HPV infection in men (HIM) study. **Virology**, v. 443, n. 2, p. 214–217, 2013.

- SMITH, J. S. et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta- analysis update. **International Journal of Cancer**, v. 121, p. 621–632, 2007.
- SMITS, H. L. et al. Intermethod variation in detection of human papillomavirus DNA in cervical smears. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 33, n. 10, p. 2631-6, 1995.
- STANLEY, M. A. Replication of human papillomaviruses in cell culture. **Antiviral Research**, v. 24, p. 1–15, 1994.
- STANLEY, M. A. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 215–22, 2012.
- STERLING, J. C.; SKEPPER, J. N.; STANLEY, M. A. Immunoelectron microscopical localization of human papillomavirus type 16 L1 and E4 proteins in cervical keratinocytes cultured in vivo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 100, p. 154–8, 1993.
- STERN, Y. et al. Immunocompetency in children with recurrent respiratory papillomatosis: prospective study. **Annals of Otolaryngology & Laryngology**, v. 116, p. 169-171, 2007.
- SOLOMON, D. et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. **JAMA**, v. 287, p. 2114–9, 2002.
- SUN, X. W. et al. Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. **New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 1343–1349, 1997.
- SYRJÄNEM, K. J.; SYRJÄNEM, S. M. Papillomavirus infections in human pathology. New York. John Wiley & Sons LTD, 2000.
- TAMEGÃO-LOPES, B. et al. Prevalence of human papillomavirus infection and phylogenetic analysis of HPV-16 E6 variants among infected women from Northern Brazil. **Infectious Agents and Cancer**, v. 9, n. 1, p. 25, 2014.
- TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-9, 2013.
- TEIXEIRA, N, C. P. et al. Prevalence and risk factors for cervical intraepithelial neoplasia among HIV-infected women. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 16, p. 164-9, 2012.
- TERAI, M., DESALLE, R., BURK, R.D. Lack of canonical E6 and E7 open reading frames in bird papillomaviruses: *Fringilla coelebs* papillomavirus and *Psittacus erithacus timneh* papillomavirus. **Journal of Virology**, v. 76, p. 10020–10023, 2002.
- THORLAND, E. C. et al. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. **Oncogene**, v. 22, n. 8, p.1225–37, 2003.
- TORNESELLO, M. L. et al. Identification and functional analysis of sequence rearrangements in the long control region of human papillomavirus type 16 Af-1 variants isolated from Ugandan penile carcinomas. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 2969–2982, 2000.

- TORNESELLO, M. L. et al. Analysis of human papillomavirus type-16 variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. **Journal of Medical Virology**, v. 74, p. 117–126, 2004.
- TORNESELLO, M. L. et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes and their variants in high risk West Africa women immigrants in South Italy. **Infectious agents and cancer**, v. 2, p. 1-9, 2007.
- TORRES, M. et al. Prevalence of beta and gamma human papillomaviruses in the anal canal of men who have sex with men is influenced by HIV status. **Journal of Clinical Virology**, v. 67, p. 47–51, 2015.
- TROTTIER, H.; FRANCO, E. L. Human papillomavirus and cervical cancer: burden of illness and basis for prevention. **The American Journal of Managed Care**, v.12, p. 462-72, 2006.
- TSIODRAS, S. et al. Hybrid capture vs. PCR screening of cervical human papilloma virus infections. Cytological and histological associations in 1270 women. **BMC Cancer**, v, 10, p. 53-60, 2010.
- VANNI, T. et al. Cervical cancer screening among HIV-infected women: An economic evaluation in a middle-income country. **International Journal of Cancer**, v. 131, n. 2, p. E96–E104, 2012.
- VILLA L. L. Prophylactic HPV vaccines: reducing the burden of HPV-related diseases. **Vaccine**, v. 24, Suppl 1, S23-28, 2006.
- VILLA, L. L.; DENNY, L: Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 94, p. 71–80, 2006.
- VISCIDI, R. P. et al. Seroreactivity to human papillomavirus (HPV) types 16, 18, or 31 and risk of subsequent HPV infection: results from a population-based study in Costa Rica. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 13, p. 324–27, 2004.
- VISCIDI, R. P. et al. Human papillomavirus capsid antibody response to natural infection and risk of subsequent HPV infection in HIV-positive and HIV-negative women. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 14, p. 283–88, 2005.
- WALBOOMERS, J. M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **The Journal of Pathology**, v. 189, n. 1, p. 12–9, 1999.
- WANG, Q. et al. Functional analysis of the human papillomavirus type 16 E1^{E4} protein provides a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament re-organisation. **Journal of Virology**, v. 78, p. 821–33, 2004.
- WELTERS, M. J. et al. Frequent display of human papillomavirus type 16 E6-specific memory t-Helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter. **Cancer Research**, v. 63, n. 3, p. 636–41, 2003.
- WENTZENSEN, N. et al. A competitive serological assay shows naturally acquired immunity to human papillomavirus infections in the Guanacaste Natural History Study. **Journal of Infectious Disease**, v. 204, p. 94–102, 2011.
- WIELAND, U. et al. Erythroplasia of queyrat: coinfection with cutaneous carcinogenic human papillomavirus type 8 and genital papillomaviruses in a carcinoma in situ. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, n. 3, p. 396–401, 2000.

- WILSON, V. G. et al. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. **Virus Genes**, v. 24, p. 275–90, 2002.
- WHO. World Health Organization. Human papillomavirus vaccines. WHO position paper. *Weekly Epidemiological Record*, v. 15, p. 118–131, 2009.
- WHO. World Health Organization. Human papillomavirus laboratory manual. Immunization. **Vaccines and Biologicals**. Geneva, 2010.
- WHO. World Health Organization. Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Cancers in Brazil. Summary Report; 2010. Disponível em <<http://www.who.int/hpvcentre>> Acesso em 1 fevereiro 2016.
- WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature reviews Cancer**, v. 7, n. 1, p. 11–22, 2007.
- XI, L. F. et al. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, p. 796–802, 1997.
- XI, L. F. et al. Acquisition and natural history of human papillomavirus type 16 variant infection among a cohort of female university students. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 11, p. 343–351, 2002.
- XI, L. F. et al. Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 98, p. 1045–1052, 2006.
- XI, L. F. et al. Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 16, p. 4–10, 2007.
- YAMADA, T. et al. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States population characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2 and L1 coding segments. **Journal of Virology**, v. 69, p. 7743–53, 1995.
- YOU, J. et al. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. **Cell**, v. 117, p. 349–60, 2004.
- YUAN, H. et al. Immunization with a pentameric L1 fusion protein protects against papillomavirus infection. **Journal of Virology**, v. 75, p. 7848–7853, 2001.
- ZBAR, A. P. et al. The pathology and molecular biology of anal intraepithelial neoplasia: comparisons with cervical and vulvar intraepithelial carcinoma. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 17, p. 203–215, 2002.
- ZHENG, Z. M.; BAKER, C. C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, p. 2286-2302, 2006.
- ZHOU, J. et al. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. **Virology**, v. 185, n. 1, p. 251–7, 1991.
- ZOA ASSOUMOU, S. et al. Human papillomavirus genotypes distribution among Gabonese women with normal cytology and cervical abnormalities. **Infectious Agents and Cancer**, v. 11, n. 1, p. 2, 2016.

ZUR HAUSEN H. Papillomavirus infections - a major cause of human cancers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1288, p. 55-78, 1996.

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

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A - Padrão de digestão de tipos mucosos de HPV (BERNARD et al., 1994)

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

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

ANEXO B - Questionário Estruturado

Data:

Iniciais:

Número do prontuário:

Bairro/Município de Residência:

Naturalidade:

Data de nasc:

Idade? |_|_| anos

Escolaridade (em anos): _____ Opção sexual:

Qual é seu estado marital?

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

Profissão: _____

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

Número de pessoas que habitam em sua casa? _____

USO DE CIGARROS E DROGAS

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

1. Irregularmente, de tempo em tempo 2. Menos de 5 cigarros por dia

3. De 5 a 20 cigarros por dia 4. Mais de de 20 cigarros por dia

Se não, você já fumou?

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

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

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

Você utiliza algum medicamento do tipo?

1. Para ansiedade e stress 2. Antidepressivos 3. Não

Se sim, qual?

Você já utilizou algum outro tipo de droga?

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

Você já utizou droga injetável?

1. Sim 2. Não 3. NR

INFORMAÇÃO CONTRACEPTIVA

Você utiliza algum método contraceptivo?

1. Pilula 2. Preservativo 3. DIU 4. Muco cervical/billing

5. Temperatura 6. Tabela 7. Diafragma 8. Pilula do dia seguinte

9. Preservativo feminino 10. Não

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

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

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

HISTORIA SEXUAL E REPRODUTIVA

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

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

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

Você já teve relação sexual com indivíduo do mesmo sexo? 1. Sim 2. Não 3. NR

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

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

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

Você já recebeu dinheiro par ter relações sexuais? 1. Sim 2. Não 3. NS

Já lhe aconteceu de ser forçada a ter relação sexual contra sua vontade?

1. Sim 2. Não 3. NR

Se sim, com que idade? |_|_|_|

Isto se repetiu?

1. Sim 2. Não 3. NR

Se sim, quantas vezes? |_|_|_|_|

Quem foi a pessoa?

1. Alguém de sua família, um adulto 2. Alguém de sua família, um jovem

3. Um conhecido 4. Um desconhecido 5. Várias pessoas

Você já engravidou?

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

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

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

Você está grávida? 1. sim 2. Não 3. não se aplica

SAUDE, DST E AIDS

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

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

2. Não

Se sim, qual? _____ -

Como você descobriu essa doença/infecção?

1. Seu parceiro lhe disse que estava infectado

2. Você apresentou sintomas que a levaram procurar um serviço de saúde

3. Durante uma consulta de rotina ou por outro motivo

Na ocasião dessa doença você procurou

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

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

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

1. Sim 2. Não

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

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

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

6. Outras _____

Em que circunstância você fez o teste anti-HIV?

1. Por iniciativa própria

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

Você tem algum dos seguintes sintomas?

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

RESULTADOS EXAMES:

Citologia anal:

Anuscopia:

Biópsia:

Teste de HPV:

Variantes:

CD4:

Carga viral:

Observações:

ANEXO C - Parecer do CEP – Amostras anais

CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES

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

Título da Pesquisa: Incidência e fatores determinantes de lesões precursoras do câncer anal em pacientes HIV positivos.

Pesquisador: NEIDE APARECIDA TOSATO BOLDRINI

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 14298113.7.0000.5060

Instituição Proponente: Centro de Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 384.286

Data da Relatoria: 04/09/2013

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem inadequações, pendências já atendidas.

O projeto é relevante e trará benefícios à população, com riscos mínimos.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

VITORIA, 04 de Setembro de 2013

Assinador por:
DANIELLE CABRINI MATTOS
(Coordenador)

ANEXO D - Parecer do CEP – Amostras cervicais

CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES

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

Título da Pesquisa: Incidência e fatores determinantes de lesões precursoras do câncer anal em pacientes HIV positivos.

Pesquisador: NEIDE APARECIDA TOSATO BOLDRINI

Área Temática:

Versão: 6

CAAE: 14298113.7.0000.5060

Instituição Proponente: Centro de Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.254.427

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Emenda com justificativa baseada em evidências científicas.

- TCLE apresenta os dados referentes à metodologia descrita na emenda

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

VITÓRIA, 01 de Outubro de 2015

Assinado por:

Cynthia Furst Leroy Gomes Bueloni