

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CÊNCIAS BIOIÓGICAS**  
**MESTRADO EM CÊNCIAS BIOIÓGICAS**

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES MBL E  $\beta$ -DEFENSINA**  
**COM A INFECCÃO**  
**PELO HPV E\OU HIV EM REGIÃO ANAL E PERIANAL**

**Suany Mirella de Mattos Melo**

**Recife, 2008**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES MBL E  $\beta$ -DEFENSINA  
COM A INFECÇÃO  
PELO HPV E/OU HIV EM REGIÃO ANAL E PERIANAL

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Biotecnologia.

Aluna: Suany Mirella de Mattos Melo

Orientador: Prof. Drº. José Luiz de Lima Filho

Co-orientador: Prof. Drº. Paulo Roberto Eleutério de Souza

RECIFE, 2008

Melo, Suany Mirella de Mattos

Associação de polimorfismos nos genes MBL e  $\beta$ -defensina com infecção pelo HPV e/ou HIV em região anal e perianal / Suany Mirella de Matos Melo. – Recife: O Autor, 2008.

52 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2008.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Papilomavírus humano 2. Câncer cervical 3. Sistema imunológico 4. Polimorfismo | Título.

616.911 CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2009-176

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

Aos vinte sete dias do mês de junho de dois mil e oito, às nove horas, no Auditório do Centro de Ciências Biológicas, realizou-se a Defesa de Dissertação apresentada pela Mestranda **Suanny Mirella de Matos Melo**, intitulada: "**Associação do polimorfismo de dois genes da Imunidade Inata com a infecção pelo HPV em região anal e perianal**". A Banca Examinadora foi homologada em primeiro de fevereiro de dois mil e oito, pela PROPESQ, tendo como membros titulares os Professores: **José Luiz de Lima Filho** (Orientador), Doutor em Bioquímica, pela Universidade de Saint Andrews, Escócia, **Maria Elizabeth Cavalcante Chaves** Doutora em Bioquímica, pela Universidade de Londres, Inglaterra **Paulo Roberto Eleutério de Souza**, Doutor em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Pernambuco; **Ana Lúcia Figueiredo Porto**, Doutora em Engenharia Química, pela Universidade Estadual de Campinas/SP e **Sérgio Crovella**, Doutor em Antropologia Molecular, pela Universidade de Florência, Itália suplentes. O Prof. José Luiz de Lima deu início à Sessão, agradeceu pela presença de todos e passou a palavra à Mestranda para fazer apresentação de sua tese, que efetuou em quarenta minutos. Continuando, o presidente solicitou à Comissão Examinadora a ocupar seus lugares. A seguir, procedeu-se à arguição na seguinte ordem: Dr. Paulo Roberto de Souza (1º examinador), Dr.ª Maria Elizabeth Chaves (2º examinador), Dr. José Luiz de Lima (3º examinador). Dando continuidade, o presidente abordou a importância do trabalho desenvolvido pela aluna e, em seguida, expressou seus agradecimentos, solicitando aos convidados a gentileza de se retirarem do recinto por alguns minutos, a fim de proceder a avaliação. A Comissão Examinadora atribuiu a **Suanny Mirella de Matos Melo** a seguinte menção: "**Aprovada**" por unanimidade. Face ao resultado a mesma está apta a receber o grau de Mestre em Ciências Biológicas, Área **Biotecnologia**, pela Universidade Federal de Pernambuco. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e para constar, eu Adenilda Eugênia de Lima, Secretária, leí, dei e assinei a presente ata que também assinam os demais presentes. Recife 27 de junho de 2008.

Excento:  
Onde se lê  
suanny mirella  
leia-se  
Suanny  
Em 27/06/08  
[Assinatura]

[Assinatura]  
Suanny Mirella de Matos Melo  
Maria Elizabeth Cavalcante Chaves  
Paulo Roberto Eleutério de Souza  
Ana Lúcia Figueiredo Porto  
Sérgio Crovella  
Adenilda Eugênia de Lima  
[Assinatura]

A Deus,  
meus pais, pelo incentivo constante  
e amigos que sempre estão  
presentes  
Dedico este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

- A Deus, por ter me dado força e saúde para concluir mais essa etapa na minha vida;
- À minha mãe e a minha avó Cecília, pelo apoio, dedicação, carinho e incentivo sempre;
- Ao meu tio Walter, pela presença eterna na minha vida, pela ajuda na construção do meu caráter e amor sempre dedicado a mim, a quem sempre tive como exemplo de dignidade e ética a ser seguido;
- Ao meu pai que mesmo distante sempre comigo;
- Aos irmãos (Flávio, Dinho e Júnior), primas (Alda e Flávia) por todo carinho, compreensão, incentivo e momentos de descontração;
- Ao meu orientador, Prof. Dr<sup>o</sup>. José Luiz de Lima Filho, pelo incentivo na ciência, paciência, aprendizado e pelo convívio todos esses anos;
- Ao Meu co-orientador, Prof. Dr<sup>o</sup>. Paulo Roberto Eleutério de Souza, pela dedicação, pela aceitação desse desafio porque sem ele não teria conseguido, pelos momentos de aprendizado, pela amizade, companheirismo. Serei grata sempre;
- À Dany Brunaska, por toda amizade e eterno incentivo, exemplo de vida a ser seguido e amor à ciência;
- Às minhas amigas especiais, Maíra, Elaine, Dani Viana, Dani Renata, Marina, Fernanda por sempre estarem comigo e me divertindo sempre, sem elas também não teria conseguido;
- Aos amigos formados ao longo desses anos, Milena, Eliane, Amilcar, Rafael, Henrique, Amilcar, Natali, Gustavo, Camila Porto, Humberto, todos do laboratório de Jabotão e do Hospital Getúlio Vargas;

- Ao LIKA e seus funcionários;
- E agradeço especialmente, Nath (cunhada), Monique (Nique), Lucas (Lu), Dayse, Anna Lenira e Marbiana (Barbie) pela ajuda diária na realização dos experimentos, conversas, choros, incentivo, amizade, dedicação, apoio e carinho;
- À Dr<sup>a</sup> Anna Christina pela colaboração neste trabalho e permissão para acompanhar seu ambulatório, apoio e incentivo.

O conhecimento é orgulhoso por ter  
aprendido tanto; a sabedoria é humilde por  
não saber mais.

(William Cowper)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1 CÂNCER DO CANAL ANAL E REGIÃO PERIANAL</b> .....	<b>15</b>
<b>1.2 PAPILOMAVIRUS HUMANO</b> .....	<b>18</b>
<b>1.3 INCIDÊNCIA E EPIDEMIOLOGIA</b> .....	<b>22</b>
<b>1.4 MECANISMO DA RESPOSTA IMUNE AO HPV</b> .....	<b>24</b>
1.4.1 LECTINA LIGADORA DE MANOSE (MBL).....	26
1.4.2. PROTEÍNA BETA-DEFENSINA HUMANA 1 (HBD-1) .....	29
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
<b>2.2 ESPECÍFICOS</b> .....	<b>31</b>
<b>3. CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
<b>3.1 DELINEAMENTO DE ESTUDO</b> .....	<b>32</b>
<b>3.2. COLETA DE AMOSTRAS</b> .....	<b>32</b>
<b>3.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO</b> .....	<b>32</b>
<b>3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>3.6 ANÁLISE DE POLIMORFISMO</b> .....	<b>33</b>
3.6.1 Gene codificador da proteína ligadora de manose (MBL) .....	33
3.6.2 Gene da beta defensina humana 1 (HBD-1) .....	34
<b>3.7 ANÁLISE DE DADOS</b> .....	<b>35</b>
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
<b>4.1 DETECÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO GENE DA MBL-2</b> .....	<b>36</b>
<b>4.2 <math>\beta</math>-DEFENSINA HUMANA 1</b> .....	<b>37</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>44</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>52</b>
ANEXO 01 QUESTIONÁRIO-----	53
ANEXO 02 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO -----	54

## RESUMO

O papilomavírus humano (HPV) é um dos mais importantes agentes etiológicos envolvidos no desenvolvimento do câncer cervical. Dois dos principais fatores de risco envolvidos no desenvolvimento dessas neoplasias malignas são infecção pelo HPV e co-infecção com doenças sexualmente transmissíveis. O sistema imunológico é responsável pelo reconhecimento e eliminação de substâncias estranhas. A proteína ligadora de manose (MBL) é uma proteína sintetizada no fígado, sendo uma das vias de ativação do sistema complemento. Polimorfismos dentro da região gênica/promotora da MBL afetam a quantidade desta proteína dentro do soro, sendo associada com um importante elemento no aparecimento de várias doenças infecciosas. O gene hBD-1 é um candidato a um gene supressor tumoral encontrado alterado em 90% de câncer renal e 82% de câncer de próstata e polimorfismos dentro da região promotora têm sido associados à susceptibilidade a várias infecções virais. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo verificar a existência de correlação entre polimorfismo do gene da MBL-2 e do gene da  $\beta$ -defensina-1 com a susceptibilidade às infecções por HPV, HIV e HPV/HIV através da metodologia da PCR em tempo real. Os resultados obtidos não demonstraram associação dos polimorfismos do gene MBL-2 nos grupos estudados (HIV positivo, HPV positivo, HPV/HIV positivos). Em relação ao polimorfismo da região -44 do gene HBD-1, verificou-se associação com a susceptibilidade apenas à infecção pelo HIV entre os grupos analisados.

Palavras chave: HIV, HPV, hBD, MBL, coinfeção.

## ABSTRACT

Papillomavirus human (HPV) is one of the most important involved etiologic agents in the development of the cervical cancer. Two of the main involved factors of risk in the development of these malignant neoplasms are infection for the HPV and co-infection with sexually transmissible illnesses. The immunologic system is responsible for the recognition and elimination of strange substances. The protein binder of manose (MBL) is a protein synthesized in the liver, being one of the ways of activation of the system complement. Polymorphism inside of the promotional genic region of the MBL affects the amount of this protein inside of the serum, being associated with an important element in the appearance of some infectious illnesses. The gene hBD-1 is a candidate to a gene tumoral suppressor found modified in 90% of renal cancer and 82% of prostate cancer and polymorphism inside of the promotional region have been associated to the susceptibility to some infectious diseases. Being thus, the present study had as objective to verify the existence of correlation between polymorphism of the gene of the MBL-2 and the gene of  $\beta$  - defensin-1 with the susceptibility to the infections for HPV, HIV and HPV/HIV through the methodology of the real time PCR. The gotten results had not demonstrated association of the polymorphisms of MBL-2 gene in the studied groups (positive HIV, positive HPV, positive HPV/HIV). In relation to the polymorphisms of region -44 of gene HBD-1, association with the susceptibility only to the infection for the HIV between the analyzed groups was analysed.

**Key-words:** HIV, HPV, MBL, hBD and co-infection.

## LISTA DE FIGURA

<b>FIGURA 1 ANATOMIA DO CANAL ANAL. ....</b>	<b>19</b>
<b>FIGURA 2. DESENHO ESQUEMÁTICO DO VÍRUS HPV ATINGINDO CÉLULAS BASAIS. FONTE: <a href="http://www.gineco.com.br/hpvum.htm">HTTP://WWW.GINECO.COM.BR/HPVUM.HTM</a>, ACESSO: 21/01/0823</b>	
<b>FIGURA 3. ESTRUTURA PROTÉICA E GÊNICA DO HPV A MICROSCOPIA ELETRÔNICA DO CAPSÍDEO VIRAL. (FONTE:<a href="http://www.virology.net/bigvirology/em/papillo.gif">HTTP://WWW.VIROLOGY .NET/BIGVIROLOGY/EM/PAPILLO.GIF</a>) B GENOMA CIRCULAR DO HPV : <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/framk.cgi?db=genome&amp;gi=10337">HTTP://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/GENOMES/FRAMIK.CGI?DB=GENOME&amp;GI=10337</a>. ACESSO: 06/06/2008.....</b>	<b>24</b>
<b>FIGURA 4. ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA MBL. FONTE: <a href="http://images.google.com.br/">HTTP://IMAGES.GOOGLE.COM.BR/</a> ACESSO: 12/04/2008. ....</b>	<b>32</b>
<b>FIGURA 5. B-DEFENSINA HUMANA - ESTRUTURA PROTÉICA. FONTE: BRANDÃO ET AL., 2007.....</b>	<b>33</b>

## LISTA DE TABELA

- TABELA 1. ESTIMATIVAS PARA O ANO 2008 NO BRASIL DAS TAXAS BRUTAS DE INCIDÊNCIA POR 100.000 HABITANTES E DE NÚMERO DE CASOS NOVOS POR CÂNCER, EM HOMENS, SEGUNDO LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA. FONTE: [HTTP://WWW.INCA.GOV.BR/ESTIMATIVA/2008/INDEX.ASP?LINK=CONTEUDO\\_VIE.W.ASP&ID=5](http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo_vie.w.asp&id=5). ACESSO: 09/06/2008..... 27**
- TABELA 2. ESTIMATIVAS PARA O ANO 2008 NO BRASIL DAS TAXAS BRUTAS DE INCIDÊNCIA POR 100.000 HABITANTES E DE NÚMERO DE CASOS NOVOS POR CÂNCER, EM MULHERES, SEGUNDO LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA. FONTE: [HTTP://WWW.INCA.GOV.BR/ESTIMATIVA/2008/INDEX.ASP?LINK=CONTEUDO\\_VIE.W.ASP&ID=5](http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo_vie.w.asp&id=5). ACESSO: 09/06/2008..... 28**
- TABELA 3. DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO GENE DA MBL-2 EM PACIENTES COM HPV E CONTROLES. TESTE EXATO DE FISHER. .... 38**
- TABELA 4. DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO GENE DA BETA-DEFENSINA EM PACIENTES COM HPV E CONTROLES. TESTE EXATO DE FISHER..... 40**

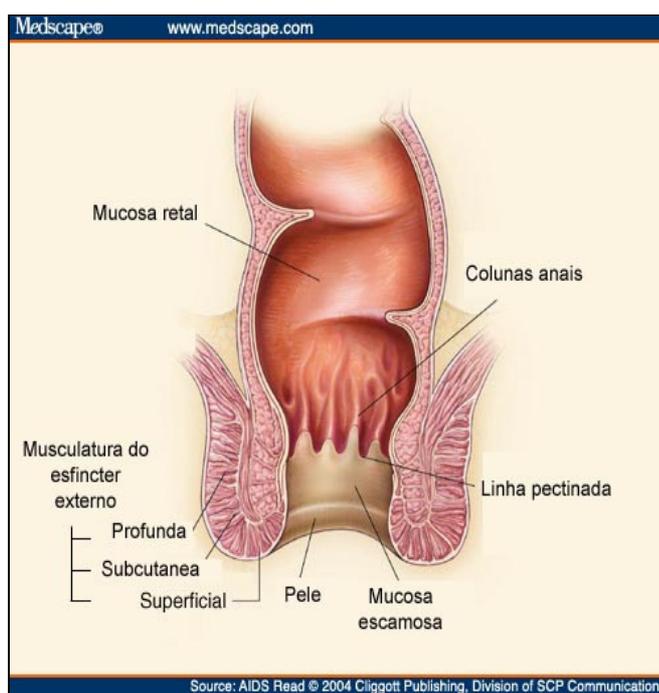
### LISTA DE ABREVIATURAS

<b>SIGLAS</b>	<b>SIGNIFICADOS</b>
LCR	Longa região controladora (do HPV)
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
APC	Célula apresentadora de antígeno
CL	Célula de Langerhan
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões
PAMP	Padrão molecular associado ao patógeno
MBL	Proteína ligadora de manose
HBD	$\beta$ -defensina humana
UTR	Região não traduzida
MASP	Serino protease associada a MNL
PCR	Reação em cadeia da polimerase
AIN 1	NEOPLASIA EPITELIAL ANAL DE GRAU 1
AIN 2	NEOPLASIA EPITELIAL ANAL DE GRAU 2
ASCUS	LESÕES DE CÉLULAS ESCAMOSAS ATÍPICAS DE SIGNIFICÂNCIA INDETERMINADA
ASIL	LESÕES INTRA-EPITELIAIS ESCAMOSAS ANAIS
ATZ	ZONA DE TRANSIÇÃO ANAL
Ct	Curva threshold
DNA	Ácido desoxoribonucléico
HIV	VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA
HP	Primer em grampo
HPV	PAPILOMA VÍRUS HUMANO
HSIL	LESÃO INTRA-EPITELIAL DE ALTO GRAU
LSIL	LESÃO INTRA-EPITELIAL DE BAIXO GRAU
NIA	NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL ANAL

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 CÂNCER DO CANAL ANAL E REGIÃO PERIANAL

O canal anal como parte terminal do intestino grosso, começando na superfície superior do anel anorectal, passando pelo assoalho pélvico até terminar no ânus (Figura 1) (WHO, 2000). O marco mais importante na mucosa é a linha dentada (pectinato) composta pelas válvulas anais bases das colunas anais. Histologicamente, a mucosa pode ser dividida em três zonas: a) porção superior - coberta pela mucosa do tipo coloretal; b) parte central - a zona de transição anal (ATZ), a qual é coberta por um epitélio especializado de aparência variável e vai desde a linha dentada (pectinada) até cerca de 0.5 a 1.0 cm acima da mesma; c) porção inferior - compreende desde a linha pectinada até a borda anal, e é chamada de pecteno (Santos Jr. *et al.*, 2007).



**Figura 1** Anatomia do canal anal.

Fonte: <http://www.medscape.com/content/2004/00/48/94/489483/art-a489483.fig1.jpg> Acessado em 25/03/07.

Na zona de transformação do canal anal, o epitélio colunar do reto se junta ao epitélio escamoso do ânus, e essa junção apresenta grande semelhança com a junção cervical (Palefsky,

1998). A maioria dos cânceres de canal anal se desenvolvem na zona de transição anal (Leiman, 2005).

Tumores no canal anal são raros, sendo responsáveis por 1,5% de todos os cânceres gastrointestinais nos Estados Unidos (Serra & Chetty, 2006), e com uma incidência de 0.8 casos por 1000.000 pessoas dentre a população geral, embora essa incidência venha aumentando nas últimas três décadas (Lampinen, 2006, Cress & Holly, 2003; Chiao *et al.*, 2005).

O carcinoma de células escamosas é a neoplasia maligna mais frequente no canal anal, compreendendo 85% de todos os carcinomas desta área (Serra & Chetty, 2006), e seus sintomas são similares aos de outras patologias anais como hemorróidas e fissuras, sendo portanto, inespecíficos (Rousseau *et al.*, 2005). Os outros, pelas diversidades histológicas, são denominados de tumores de células transicionais ou cloacogênicos, escamosos, basalóides, epitelioide e muco-epitelioídes. Prefere-se, no entanto, que sejam reconhecidos como uma variante do tipo escamoso que perdeu a diferenciação final. Como a bexiga urinária compartilha semelhante origem embriológica com o canal anal, há razão para que seu epitélio dê origem a tumores morfológicamente similares, com comportamento biológico e respostas terapêuticas parecidas entre si (Santos JR. *et al.*, 2007).

Além da diferente origem embriológica, peculiaridades anatômicas de interesse na abordagem das neoplasias epiteliais do ânus e do canal anal são as drenagens linfáticas diferentes para os segmentos proximais e distais à linha pectínea. Acima dessa, a linfa flui para os espaços perirretais e para linfonodos paravertebrais, guardando semelhança com a drenagem do adenocarcinoma do reto; abaixo da linha pectínea a linfa é direcionada para os nodos da região inguinal, aspecto que obriga exame cuidadoso do ânus e do canal anal em pacientes com adenopatia inguinal sem explicação (Santos JR. *et al.*, 2007).

As alterações histopatológicas podem variar de células escamosas atípicas de significância indeterminada (ASCUS) a lesões intra epiteliais escamosas anais (ASIL). As ASILs podem ser divididas em lesões de baixo grau (LSIL) e alto grau (HSIL). A LSIL equivale à neoplasia epitelial anal de grau 1 (AIN 1), onde menos de um terço da camada epitelial é substituída por células basalóides imaturas; e grau 2 (AIN 2), onde esta substituição compreende até dois terços da referida camada. A HSIL corresponde à AIN3, onde toda a extensão da camada epitelial está comprometida e há microinvasão da membrana basal (Martin & Bower, 2001). As

AINs são consideradas como as lesões precursoras do carcinoma de células escamosas do canal anal (Serra e Chetty, 2006).

Os principais fatores de risco envolvidos no desenvolvimento dessas neoplasias malignas são: relações homossexuais e heterossexuais, multiplicidade de parceiros, baixo nível socioeconômico, infecção pelo HPV, co-infecção com doenças sexualmente transmissíveis, relação sexual anal com indivíduos HIV positivos (Serra & Chetty, 2006; Maggagard *et al.*, 2003). (Frisch *et al.*, 1997; Nonnenmacher *et al.*, 2002). Outros estudos já evidenciaram uma maior probabilidade de desenvolvimento de displasias, condilomas perianais e neoplasia intra-epitelial anal (NIA) naqueles indivíduos com prática freqüente de sexo anal, soropositividade para HIV (Palefsky *et al.*, 1992); imunodepressão (Palefsky *et al.*, 1991, Palefsky, 1998); lesões verrugosas acima da linha pectínea (Manziona *et al.*, 2004), tipo de HPV (Xi *et al.*, 1998; Lajous *et al.*, 2005 ) e alta carga viral (Leiman, 2005; Daling, 2004). Dentre estes vários agentes etiológicos, os principais são a presença do vírus da imunodeficiência humana (HIV), combinado com o HPV (Manziona *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2004).

A incidência precisa de câncer anal entre os homens com histórico de relações sexuais anais é difícil de determinar, uma vez que os registros sobre câncer não coletam informações sobre orientação ou comportamento sexual (Palefsky, 1998)

A região perianal é a área extra-genital mais freqüentemente acometida pelo HPV nos doentes HIV-positivos, com uma incidência de até 62% dos casos (adultos jovens, entre 20 a 24 anos) (Nadal *et al.*, 1999). Embora poucos estudos tenham sido realizados relacionando o envolvimento dos cânceres perianais com o HPV, algumas de suas manifestações podem representar cânceres do canal anal em estágio avançado com extensões para o epitélio perianal, onde o local exato de origem não pode ser bem determinado (Friesch, 1999).

As manifestações clínicas na região anal e urogenital podem ser observadas de duas formas: i) verrugas genitais que aparecem na vagina, pênis e ânus; ii) lesões microscópica, que aparece no pênis, vagina e colo de útero. (<http://www.gineco.com.br/hpvum.htm>, acesso: 21/01/2008). Atualmente, o estudo histopatológico constitui o método diagnóstico mais importante da mucosa retal e aconselha-se que seja realizado, embora não patognomônico, para o esclarecimento da etiologia de processos inflamatórios e/ou tumorais (Diaz *et al.*, 2002). O diagnóstico histopatológico de amostras teciduais obtidos por endoscopia ainda é essencial e crucial, para determinação dos procedimentos terapêuticos iniciais (Abdel-Hardy & Bunn, 2004).

O tratamento do carcinoma anal pode, atualmente, ser dividido em cirúrgico e clínico; consistindo, o cirúrgico, na excisão local da lesão ou na amputação abdominoperineal do ânus e do reto e, o clínico, na preservação do segmento ano-retal, por meio do uso da quimiorradiação ou da radioterapia isolada ([http://www.sppv.org/info\\_ciencia.html](http://www.sppv.org/info_ciencia.html), acesso: 27/01/2008.). Atualmente, o tratamento de escolha para a neoplasia maligna de canal anal é uma terapia combinada (CMT), onde o paciente recebe uma carga terapêutica de radiação externa (EBRT) mais uma combinação de quimioterápico citotóxico e agente antibiótico antitumoral; sendo a ressecção abdominoperineal (APR) reservada somente como terapia de salvamento aos pacientes sem resposta completa à CMT ou aos impossibilitados de receber uma carga terapêutica adicional (Rousseau *et al.*, 2005).

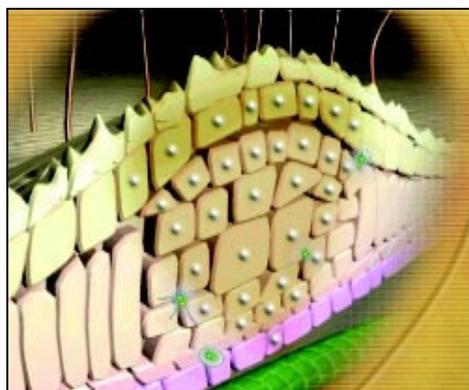
## **1.2 PAPILOMAVIRUS HUMANO**

O papilomavírus humano (HPV do inglês “Human Papillomaviruses”) é um dos mais importantes agentes etiológicos envolvidos no desenvolvimento do câncer cervical (BRENNAN *et al.*, 2003). Embora haja clara evidência da associação do HPV com as lesões precursoras do câncer cervical, a infecção pelo HPV foi inicialmente reconhecida como a causa das verrugas cutâneas (BURD, 2003). O desenvolvimento das pesquisas focando a história natural da infecção pelo HPV teve uma contribuição maciça do virologista alemão Harald zur Hausen. Este, junto com outros pesquisadores, iniciou a postular e analisar o possível papel do HPV no câncer cervical entre os anos 1974 e 1976 (zur HAUSEN, 2002; BURD, 2003). De fato, os primeiros tipos virais foram apenas isolados e, posteriormente, clonados diretamente de biópsias do cervix no início da década de 80, particularmente em 1983 e 1984, para o HPV-16 e HPV-18, respectivamente (zur HAUSEN, 2002). Atualmente, o HPV está associado a uma variedade de condições clínicas que acometem tanto a mulher quanto o homem, promovendo desde lesões inócuas ao câncer (BURD, 2003).

Já foram identificados mais de 100 tipos de HPV até o momento, e 40 desses patógenos infectam a região genitourinária, onde apresentam um papel reconhecidamente importante no desenvolvimento de neoplasias nessa área (Zur, 1996). Seu diagnóstico é dado pelo exame da lesão e confirmado pela biópsia, com a identificação do tipo de HPV pelas técnicas de biologia molecular (captura híbrida ou PCR). O tratamento, dependendo da lesão, pode ser clínico e/ou

cirúrgico, obtendo-se apenas a cura clínica, pois o vírus permanece no epitélio da mucosa ou pele após o tratamento (Castro *et al.*, 2004), uma vez que somente o sistema imunológico do indivíduo é capaz de abolir o vírus (Watson, 2005).

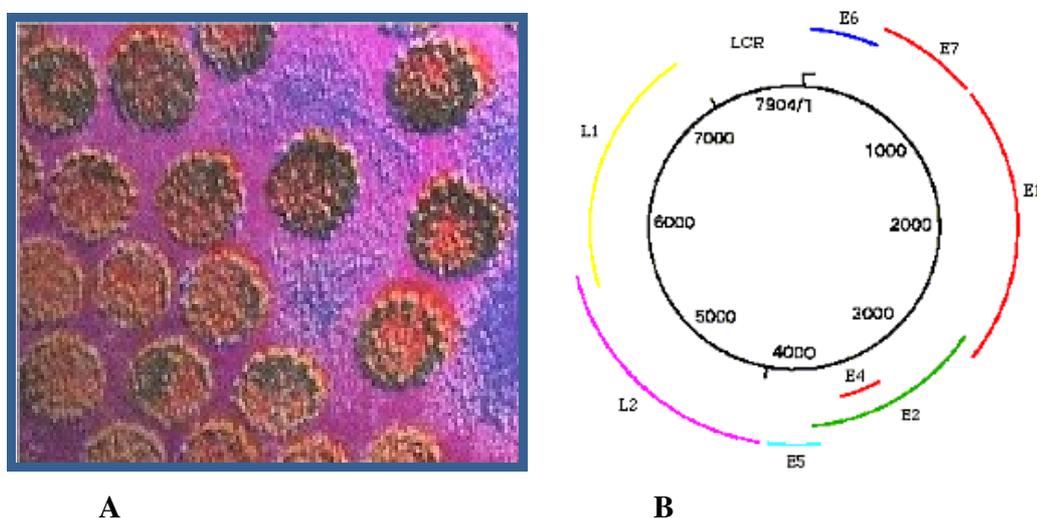
O papilomavírus humano penetra no organismo por meio de lesões teciduais, atingindo as células basais da mucosa do colo uterino (Figura 2). Como estas células não têm resposta eficiente aos antígenos, o HPV permanece em seu interior, sem desencadear resposta imunológica, determinando atraso em seu reconhecimento pelo sistema imune, o que facilita sua multiplicação (Zimmermann *et al.*, 2006). O HPV necessita de lesões de continuidade para penetrar o epitélio, instalando-se nos núcleos da camada basal. Caso não ocorra replicação, pode se estabelecer de forma latente, não provocando doença. Entretanto, a infecção por esse vírus pode resultar em proliferação celular, causada pela desregulação do ciclo celular. Essas células contaminadas sofrem diferenciação progressiva conforme ascendem dentro do epitélio provocando lesões subclínicas e posteriormente clínicas, e levando ao desenvolvimento de neoplasia intra-epitelial escamosa em que parte desse epitélio é substituída por células imaturas assemelhando-se às da camada basal (Nadal *et al.*, 2007).



**Figura 2.** Desenho esquemático do vírus HPV atingindo células basais.  
Fonte: <http://www.gineco.com.br/hpvum.htm>, acesso: 21/01/08

Como 2/3 dos pacientes que tiveram contato sexual com indivíduos com verrugas genitais desenvolveram a doença, acredita-se que o aparecimento das lesões provocadas pelo HPV dependa do grau de resistência individual ao vírus, da imunidade sistêmica e de fatores locais, inclusive imunidade local (Nadal *et al.*, 2007).

Os HPVs, pertencentes a família Papovaviridae, são pequenos vírus não-envelopados de 55 nm de diâmetro que apresentam grande resistência ao calor (BURD, 2003; ZHENG *et al.*, 2006). O vírion maduro é formado por um capsídeo icosaédrico (Figura 3) protéico constituído por no mínimo duas proteínas estruturais virais, a L1 e a L2. A proteína L1 perfaz 80% de toda a produção protéica viral e ao organizar-se em pentâmeros forma a unidade central do capsídeo, os capsômeros. Ao todo, 72 capsômeros formam o capsídeo viral dando ao vírus do papiloma humano a aparência de uma “bola de golfe” (zur HAUSEN, 2002; BRENNAN *et al.*, 2003; BURD, 2003). Por definição um novo tipo de HPV é identificado quando apresenta mais de 10% de variação na seqüência de DNA da região codificante da proteína estrutural L1 (GOSTOUT *et al.*, 1999).



**Figura 3.** Estrutura protéica e gênica do HPV **A** Microscopia eletrônica do capsídeo viral. (Fonte:<http://www.virology.net/BigVirology/EM/papillo.gif>) **B** Genoma circular do HPV : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/frameshift.cgi?db=genome&gi=10337>. Acesso: 06/06/2008.

O capsídeo icosaédrico protéico protege o genoma circular de DNA dupla fita do HPV que possui aproximadamente 7,9kb (BRENNAN *et al.*, 2003; BURD, 2003; ZHENG *et al.*, 2006). Ao longo do genoma viral existem 8 ORFs (do inglês “Open Reading Frames” traduzido como Quadro Aberto de Leitura), ou seja, 8 seqüências de DNA que codificam proteínas, e uma longa região controladora (LCR) da expressão dos genes virais e da duplicação genômica. Basicamente, o genoma pode ser funcionalmente dividido em três regiões distintas: (1) genes tardios (do inglês “Late gene” L1-L2) que são expressos secundariamente após a infecção, cujas

proteínas são responsáveis pela formação do capsídeo, (2) Genes precoces (do inglês “Early gene” E1-E7) que são caracterizados pela expressão inicial durante o ciclo de vida do vírus e controlam a transcrição e replicação viral, atuando na transformação celular, (3) e por uma LCR, que apresenta vários sítios de ligação a repressores e ativadores da transcrição estando também envolvida nos processos de replicação (RODEN *et al.*, 2004; MONTROYAMA *et al.*, 2004).

Os diferentes tipos de HPV podem ser classificados em mucosos e cutâneos, e em cada um desses grupos, os vírus podem ser designados individualmente como de alto ou baixo risco, de acordo com sua propensão à progressão maligna das lesões que os mesmos originam (Münger *et al.*, 2004). O mecanismo de oncogênese viral parece estar associado à inibição do controle do ciclo celular (Rousseau, 2005). Os genes E6 e E7 codificam oncoproteínas que têm como alvo as proteínas Rb e p53 respectivamente, que são proteínas codificadas por genes supressores tumorais. A proteína E6 do HPV se liga e degrada a proteína celular p53 por uma via mediada pela ubiquitina, enquanto a proteína E7 inativa a proteína celular pRb (Palefsky, 1998; Palefsky & Holly, 1995); levando à instabilidade genômica da célula, a qual continua seu ciclo, a despeito do dano cromossomal (Palefsky, 1998; Livingstone *et al.*, 1992; Carder *et al.*, 1993). O Rb (gene do retinoblastoma) impede a célula de prosseguir a divisão celular, ao bloquear o fator de transcrição E2F. A p53 tem o mesmo efeito ao aumentar a expressão de p21, além de também desencadear a apoptose em casos de dano extenso ao DNA.

Os papilomavírus inicialmente infectam as células epiteliais basais, as quais constituem a única camada celular epitelial que se divide ativamente. O DNA viral é mantido a uma quantidade baixa de cópias no interior do núcleo da célula hospedeira, ao passo que esta sofre diferenciação e é empurrada em direção à superfície do epitélio; onde os vírus serão liberados ao meio ambiente com a descamação da pele (Münger *et al.*, 2004).

As mudanças no epitélio cervical associadas aos eventos iniciais da formação do câncer cervical podem ser classificadas patologicamente como neoplasia intraepitelial cervical (NIC) do tipo I, II ou III, de acordo com o grau citológico da lesão. NIC I são caracterizadas por lesões mais amenas e associadas à replicação e expansão viral (RODEN *et al.*, 2004), podendo progredir para lesões mais severas, NIC II ou NIC III. Ambas as lesões podem finalmente tornar-se invasivas levando a formação do câncer (BURD, 2003).

A integração do DNA do HPV no genoma do hospedeiro leva à linearização do genoma do vírus em qualquer região compreendida entre os genes *E1* e *L1*, e inativação do gene *E2* por

corte ou deleção quando da integração. Este gene (*E2*) codifica uma proteína homônima responsável pela regulação da expressão dos genes *E6* e *E7*, pelo que a sua perda induz a expressão “descontrolada” dos genes *E6* e *E7*, produzindo alterações fenotípicas na célula ([http://www.sppv.org/info\\_ciencia.html](http://www.sppv.org/info_ciencia.html). Acesso: 27/01/2008).

Especula-se que nos eventos iniciais do crescimento viral ocorre a amplificação do genoma viral de cerca de 1-10 para 50-100 cópias por célula infectada. Esses eventos iniciais acontecem no compartimento proliferativo do epitélio, com a expressão dos genes virais, *E1*, *E2*, *E6* e *E7* (STANLEY, 2005). As células basais infectadas se dividem, ocorrendo a expansão, lateral e longitudinal, da infecção com a migração das células infectadas para a camada supra-basal de diferenciação celular (zur HAUSEN, 2002). A expressão dos genes virais, *E6*, *E7*, *E1*, *E2*, *E5* e *E4*, tornam-se altamente “upregulated” gerando milhares de cópias do genoma viral por célula. Os genes tardios, *L1* e *L2*, são também expressos na camada mais superior, onde ocorre a união dos elementos virais para sua posterior liberação (zur HAUSEN, 2002; STANLEY, 2005). O tempo da infecção à liberação do vírus maduro é aproximadamente 3 semanas, ou seja, o tempo necessário para que os queratinócitos basais realizem a completa diferenciação e descamação (STANLEY, 2005).

### **1.3 INCIDÊNCIA E EPIDEMIOLOGIA**

O vírus HPV pode ser encontrado em 30 a 40% de indivíduos assintomáticos sexualmente ativos (Gonçalves & Donadi, 2004). A infecção pelo HPV, principalmente na região cervical, é altamente prevalente (sendo detectada em aproximadamente 10% a 20% da população sexualmente ativa entre 15 a 49 anos de idade (Koutsky *et al.*, 1998). Cerca de 10% dos pacientes infectados podem apresentar verrugas, papilomas ou displasias, bem como a possibilidade de progressão do carcinoma “in situ” para invasor, na maioria dos casos, na zona de transição do canal anal (Modesto & Gottesman, 1994).

O número de casos novos de câncer de cólon e reto estimados para o Brasil no ano de 2008 é de 12.490 casos em homens (Tabela 1) e de 14.500 em mulheres (Tabela 2). Estes valores correspondem a um risco estimado de 13 casos novos a cada 100 mil homens e 15 para cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de cólon e reto em homens é o terceiro mais freqüente na região Sudeste (19/100.000). Nas regiões Sul

(21/100.000) e Centro-Oeste (10/100.000) ocupa a quarta posição. Nas regiões Nordeste (4/100.000) e Norte (3/100.000), ocupam a quinta e sexta posição, respectivamente. Para as mulheres é o segundo mais freqüente na região Sudeste (21/100.000), o terceiro mais freqüente nas regiões Sul (22/100.000), Centro-Oeste (11/100.000) e Nordeste (6/100.000), enquanto na região Norte (4/100.000) é o quinto mais freqüente ([http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo\\_view.asp&ID=5](http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5). Acesso: 09/06/2008).

**Tabela 1.** Estimativas para o ano 2008 no Brasil das taxas brutas de incidência por 100.000 habitantes e de número de casos novos por câncer, em homens, segundo localização primária. Fonte: [http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo\\_view.asp&ID=5](http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5). Acesso: 09/06/2008.

Homens				
Localização Primária Neoplasia maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	49.530	52,43	13.990	67,81
Traquéia, Brônquio e Pulmão	17.810	18,86	5.150	24,91
Estômago	14.080	14,92	3.590	17,42
Cólon e Reto	12.490	13,23	4.360	20,99
Cavidade Oral	10.380	11,00	3.000	14,45
Esôfago	7.900	8,35	1.640	7,84
Leucemias	5.220	5,52	1.460	7,06
Pele Melanoma	2.950	3,09	830	3,80
Outras Localizações	55.610	58,87	17.010	82,32
<b>Subtotal</b>	<b>175.970</b>	<b>186,29</b>	<b>51.030</b>	<b>246,97</b>
Pele não Melanoma	55.890	59,16	13.230	64,02
<b>Todas as Neoplasias</b>	<b>231.860</b>	<b>245,47</b>	<b>64.260</b>	<b>310,99</b>

**Tabela 2.** Estimativas para o ano 2008 no Brasil das taxas brutas de incidência por 100.000 habitantes e de número de casos novos por câncer, em mulheres, segundo localização primária. Fonte: [http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo\\_view.asp&ID=5](http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5). Acesso: 09/06/2008.

Mulheres				
Localização Primária Neoplasia maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Mama Feminina	49.400	50,71	17.400	76,04
Colo do Útero	18.680	19,18	5.620	24,49
Cólon e Reto	14.500	14,88	5.450	23,80
Traquéia, Brônquio e Pulmão	9.460	9,72	3.070	13,49
Estômago	7.720	7,93	2.380	10,30
Leucemias	4.320	4,44	1.340	5,89
Cavidade Oral	3.780	3,88	1.140	4,83
Pele Melanoma	2.970	3,03	930	3,69
Esôfago	2.650	2,72	620	2,30
Outras Localizações	62.270	63,93	22.530	98,39

#### 1.4 MECANISMO DA RESPOSTA IMUNE AO HPV

O sistema imunológico é responsável pelo reconhecimento de substâncias estranhas ao organismo e sua eliminação, pela remoção de células mortas e/ou danificadas e pela destruição de células mutantes e cancerosas (LEHNER, 2003; SIERRA *et al.*, 2005; MAGNADÓTTIR, 2006).

O sistema imune humano apresenta dois componentes principais envolvidos no mecanismo de eliminação das partículas estranhas, chamadas de antígenos, quais sejam, a imunidade inata e a imunidade adquirida que proporcionam respostas diferentes, tais como, sistema de reconhecimento, células envolvidas e mecanismos de ação. Juntas completam um complexo sistema de interações e respostas com maior eficiência na eliminação do antígeno. A imunidade inata é a primeira linha de defesa e está presente na maioria dos organismos. Os receptores das células do sistema imune inato foram desenvolvidos durante o processo evolucionário. Por outro lado, os receptores das células do sistema imune adquirido são desenvolvidos durante os rearranjos gênicos, sendo restritos a determinados grupos de seres vivos. (LEHNER, 2003; SIERRA *et al.*, 2005; MAGNADÓTTIR, 2006).

Embora a resposta imune à infecção ocasionado pelo HPV ainda não tenha sido completamente elucidada (GONÇALVES *et al.*, 2004), alguns modelos baseados nas evidências imunológicas alcançadas, atualmente, podem nos dar uma idéia parcial dos reais mecanismos indutores e efetores da resposta imune contra o HPV (GONÇALVES *et al.*, 2004; TYRING, 2000; STANLEY, 2005). As evidências sugerem que a resposta imune à esta infecção seja multifatorial (TYRING, 2000) e dependa primariamente da resposta imune mediada por célula (BURD, 2003; STANLEY, 2005), particularmente aquelas envolvidas no compartimento anogenital.

O modelo básico da resposta imune celular contra o HPV envolve primariamente o processamento e a apresentação dos antígenos virais pelas células de Langerhans (CL). Na superfície dessas APCs (Células Apresentadoras de Antígenos) encontram-se um grupo particular de receptores, os receptores padrões de reconhecimento (PRR, do inglês “pattern recognition receptors”), que reconhecem os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMP, do inglês “pathogens-associated molecular pattern”) presentes na estrutura do HPV. Juntamente com esse reconhecimento, entre PRR e PAMP, a ligação de citocinas pró-inflamatórias às CLs parece ser de fundamental importância, pois ativa tanto o processamento do antígeno como também a sua migração para os linfonodos. Durante a migração as CLs tornam-se maduras e altamente especializadas na apresentação de antígenos via MHC classe II e capazes de ativar as células T nos linfonodos fazendo com que eles, via eferente, migrem para o sítio de infecção, mas especificamente para os queratinócitos infectados como células T efectoras (STANLEY, 2005).

O mecanismo de evasão viral envolve vários fatores. Primeiro, o ciclo natural de infecção do HPV já é por si só um eficiente mecanismo de inibição da resposta imune, de forma que a replicação viral provoca efeitos citopatológicos. Em outras palavras, os queratinócitos morrem devido às “causas naturais” e libera pouco ou nenhum sinal de perigo, na forma de citocinas, para o sistema imune. Em adição, os queratinócitos são programados para morrer e descamar em regiões longes dos sítios de vigilância imunológicas (STANLEY, 2005). O papel das proteínas solúveis da imunidade inata na infecção pelo HPV também ainda está longe de ser compreendida e o conhecimento está basicamente restrito a atuação de certas citocinas/quimiocinas (GONÇALVES *et al.*, 2004).

O sistema imune humano tem desenvolvido uma cascata em rede para se defender dos patógenos devido a sua capacidade de reconhecer e eliminar rapidamente microorganismos. O sistema complemento é um componente essencial e eficaz nesta defesa. Ele é um componente central da resposta inata e cumpre numerosas funções, incluindo a ativação da imunidade adaptativa e a remoção dos detritos celulares. Há três mecanismos estabelecidos de ativação do sistema complemento, são eles: clássico, via das lectinas e via alternativa. No entanto, muitos patógenos têm maneiras de “escapar” do ataque do sistema complemento, através de diferentes mecanismos (Lambris *et al.*, 2008).

#### 1.4.1 LECTINA LIGADORA DE MANOSE (MBL)

A proteína ligadora de manose (MBL) é uma proteína de fase aguda sintetizada primariamente no fígado e que faz parte da família das colectinas (proteínas que contém um domínio lectina e um domínio colágeno (McBride *e cols.*, 1998) (Figura 4). Um dos mecanismos de ativação do sistema complemento, como descrito acima, é dado pela via das lectinas. Essa ativação ocorre devido a uma associação da MBL com as serino proteases também chamadas de MASPs (“MBL-associated serine proteases”). A MBL ao reconhecer os carboidratos dos patógenos, principalmente a manose, N-acetilglucosamina e fucose, realiza a auto-clivagem da MASP, de modo que a porção que permanece associada a MBL possa ativar o sistema complemento através da clivagem do seu componente C4 (WALLIS, 2003).

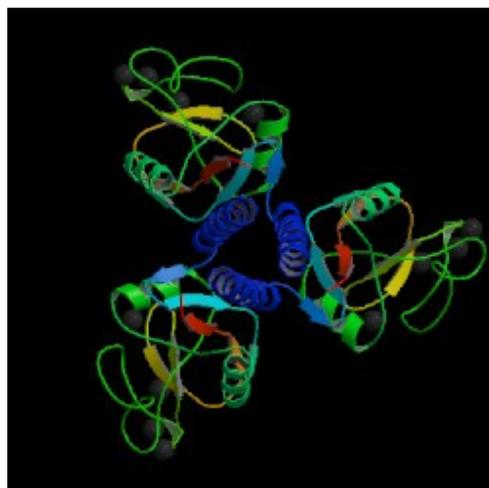
O principal papel da MBL no sistema imune inato humano é se ligar ao sistema imune adaptativo (IP *et al.*, 2004; WALLIS, 2003). Tal tarefa é desempenhada quando suas várias “cabeças” reconhecedoras de carboidratos são ligadas à superfície de uma grande variedade de microorganismos gerando uma cascata de reações que ativam o sistema complemento (MULLIGHAN *et al.*, 2000; WALLIS, 2003; STEFFENSEN *et al.*, 2003; IP *et al.*, 2004).

A unidade estrutural básica da MBL é um homotrímero de peptídeos de MBL (subunidades) que se autoassociam dentro de uma tripla hélice semelhante a um colágeno. Ela contém quatro domínios distintos: Um curto domínio N-terminal, rico em cisteína, seguido por um domínio colágeno, uma porção  $\alpha$ -hélice chamada de pescoço e um domínio C-terminal de reconhecimento de carboidratos (CRD) (Wallis *e cols.*, 2003). Cadeias peptídicas idênticas de subunidades de 32 kDa associam-se dentro de trímeros pelo seu domínio colágeno formando

tripla hélices que são estabilizadas por pontes dissulfeto formadas entre resíduos de cisteína nos domínios N-terminal. O padrão de pontes dissulfeto é heterogêneo e assimétrico (Wallis, 2003).

A MBL do soro é uma estrutura multimérica composta de mais de 6 trímeros (complexo multimérico reunidos como um bouquet de tulipas) que circulam na corrente sanguínea como tetrâmeros, pentâmeros ou hexâmeros da unidade estrutural (Whortley *e cols.*, 2005) e cada peptídeo possui um domínio C terminal dependente de cálcio que reconhece oligossacarídeos ricos em manose e N-acetilglicosamina presentes numa ampla variedade de bactérias, vírus, fungos e parasitas (Wallis, 2003). Contudo, a MBL não se liga a células humanas normais porque os açúcares que elas apresentam na sua superfície frequentemente terminam em ácido siálico, que não é ligadora. Por outro lado, padrões de glicosilação em células tumorais são frequentemente diferentes daqueles de células normais e algumas células tumorais são reconhecidas pela MBL (Wallis, 2003).

O gene que codifica a MBL é encontrado no cromossomo 10 (10q11.2-q21) (GARRED *et al.*, 1997) e é formado por 4 exons. O primeiro deles codifica a porção rica em cisteína e uma parte do domínio de colágeno. A outra, o domínio de colágeno, é codificado pelo exon 2. Os outros exons, 3 e 4, são encarregados de codificar a região do pescoço e o domínio reconhecedor de carboidrato (WALLIS, 2003; GARRED *et al.* 1997).



**Figura 4.** Estrutura tridimensional da MBL. Fonte: <http://images.google.com.br/> Acesso: 12/04/2008.

Nos últimos anos, a deficiência da MBL tem sido associada com um importante elemento no aparecimento de várias doenças: infecções recorrentes, especialmente em crianças, imunodeficiências secundárias tais como a infecção pelo HIV, quimioterapia para câncer, doenças cardíacas arteroscleróticas/ coronárias, fibrose cística, doenças autoimune (Lupus eritematoso sistêmico (SLE)/ artrite reumatóide (RA)) (Caroll & Janeway, 1999; Christiansen *e cols.*, 1999; Garred *e cols.*, 1997; 1999 a,b; Graudal *e cols.*, 1998; Kilpatric *e cols.*, 1995; Madsen *e cols.*, 1998a; Peterslund *e cols.*, 2001; Sumyia *e cols.*, 1991; Summerfield *e cols.*, 1997).

A baixa concentração de MBL no soro está associada com um defeito opsônico comum e também abole a capacidade de MBL ativar o complemento (McBride *e cols.*, 1998). Tais defeitos freqüentemente aparecem como infecções bacterianas e fungicas em crianças e são encontradas em 25% de crianças com infecções freqüentes não explicadas. Crianças com o defeito sofrem aproximadamente duas vezes aumento em infecções severas, comparadas com crianças controle (Jack *e cols.*, 2001).

Há cinco sítios polimórficos conhecidos dentro da região gênica/promotora da MBL que afeta a quantidade desta proteína dentro do soro. Dois estão situados dentro da região promotora do exon-1 MBL [**H** ou **L** (G/C) na posição -550 e **Y** ou **X** (C/G) na -221]. Estas mutações afetam a atividade transcricional do complexo promotor-basal, que resulta em níveis circulantes reduzidos da MBL, embora ambos os polimorfismos no promotor afetem o nível de MBL produzida, -221 Y para X resulta em níveis muito mais baixos do que H para L (Madsen *e cols.*, 1995).

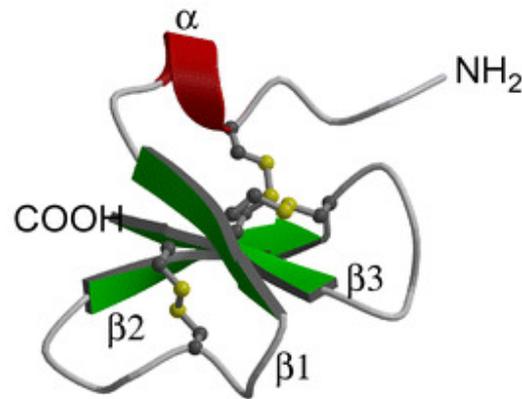
Os três restantes sítios polimórficos estão situados dentro do exon 2 do gene MBL e tem sido descritos no códon 52 (CGT para TGT) (Madsen *e cols.*, 1994), codon 54 (GGC para GAC) (Symiya *e cols.*, 1991) e codon 57 (GGA para GAA) (Lipscombe *e cols.*, 1992), resultando nas substituições dos aminoácidos Arg por Cys, Gly por Asp e Gly por Glu, respectivamente. Substituições nos codons 54 e 57 produzem uma alteração no aminoácido que quebra a estrutura do esqueleto colágeno Gly-Xaa-Yaa levando a uma ligação limitada entre as subunidades da MBL, causando níveis significativamente reduzidos da proteína funcional circulante no soro (Sumiya *e cols.*, 1991; Lipscombe *e cols.*, 1992). A substituição de Cys por Arg, codificada pela mutação no codon 52, pode resultar na formação de uma ponte dissulfeto extra, diminuindo a estabilidade da molécula (Madsen *e cols.*, 1994).

#### 1.4.2. PROTEÍNA B-DEFENSINA HUMANA 1 (HBD-1)

Defensinas são pequenos peptídeos catiônicos antimicrobianos (YANG *et al.*, 1999) e são encontrados em diversos organismos. No homem, as defensinas são divididas em duas sub-famílias:  $\alpha$ - e  $\beta$ -defensinas. Essas últimas, são peptídeos não glicosilados ricos em arginina com cerca de 30 a 48 aminoácidos onde seis resíduos de cisteína formam três pontes dissulfeto gerando uma estrutura com duas folhas beta antiparalelas (BOMAM, 1998).

A  $\beta$ -defensina humana (HBD) tem uma importante função na proteção contra a invasão dos patógenos humanos, já que possui amplo espectro contra bactérias, fungos e vírus envelopados (BOMAM, 1998). Isto se deve ao fato da interação eletrostática da HBD com a membrana aniônica do patógeno, ocorrendo mudança na sua permeabilidade e formando poros iônicos e “gaps” (BALS, 2000). Assim, as HBD são uma das primeiras formas de defesa do sistema imune inato, ligando-o ao sistema imune adaptativo através da quimioatração de células T de memória e células dendríticas (CD) mediadas pelo receptor CCR6, bem como atuando na maturação das CD (YANG *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 2001; RAJ *et al.*, 2002).

Atualmente, 4 tipos de HBD têm sido bem caracterizados (SCHUTTE *et al.*, 2002; JUVERIC *et al.*, 2003). Entre eles, encontramos a HBD-1 que é codificada por um gene localizado no cromossomo 8 (8p22-p23) composto por dois exons (VANKEERBERGHEN *et al.*, 2005). Esta defensina é expressa pelas células epiteliais e pelos queratinócitos, podendo ser induzida pela presença de microrganismos e fatores inflamatórios, visto que na região 5'UTR contém sítios de ligação consenso para interleucina-6-fatores nucleares e interferom- $\gamma$  (RAJ *et al.*, 2001). O primeiro produto pós-tradução é um pré-propeptídeo, de maneira que, o exon 1 codifica uma região sinal N-terminal e uma porção do segmento pro-, e o exon 2 codifica a porção final do segmento pro- e o peptídeo catiônico que apresenta atividade antimicrobiana após clivado (Figura 5) (BALS, 2000).



**Figura 5.**  $\beta$ -defensina humana - Estrutura protéica. Fonte: Brandão *et al.*, 2007.

A HBD-1 é um candidato a gene supressor tumoral encontrada alterada em 90% de câncer renal e 82% de câncer de próstata (Sun *et al.*, 2007). Dork & Stuhmann (1998) estudaram variações na região promotora e codificadora do gene da HDB-1 e sua possível associação com a fibrose cística. Polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) na posição -44 (C→G) da região 5'UTR é fortemente conservado em outros primatas e apresenta importante papel na modulação na expressão da HBD-1 (BRAIDA *et al.*, 2004). Braida *et al.* (2004) mostraram uma significativa correlação entre o SNP na região 5'-UTR do gene da hBD-1 e o risco de infecção em recém-nascidos na população pediátrica italiana.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Verificar a existência de correlação entre polimorfismo do gene da MBL-2 e do gene da  $\beta$ -defensina-1 com a susceptibilidade às infecções por HPV, HIV e HPV/HIV.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Detectar a presença de polimorfismo no gene da MBL-2 e da  $\beta$ -defensina-1 em amostras de DNA de pacientes infectados por HPV e indivíduos não infectados pelo HPV (grupo controle), pacientes infectados por HIV e indivíduos não infectados pelo HIV (grupo controle) e por último, em pacientes infectados por HPV e HIV e indivíduos não infectados com os dois tipos virais (grupo controle), utilizando a técnica da PCR em Tempo Real;
- Correlacionar os dados laboratoriais dos polimorfismos dos dois genes codificadores de proteínas da imunidade inata, acima referidos, com a susceptibilidade às infecções anteriormente citadas.

### **3. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

#### ***3.1 DELINEAMENTO DE ESTUDO***

A população de estudo foi composta por quatro grupos, sendo assim definidos: o primeiro grupo foi formado por 20 pacientes HIV positivo, todos provenientes do IMIP (Instituto Materno Infantil de Pernambuco); o segundo, composto por 15 pacientes HPV positivo provenientes do mesmo local anteriormente citado; o terceiro grupo foi formado por 18 pacientes co-infectados por ambos os vírus (HPV/HIV) atendidos nos ambulatórios de coloproctologia do Hospital das Clínicas – UFPE, Hospital Correia Picanço (HCP), Hospital Oscar Coutinho e Instituto Materno Infantil de Pernambuco (IMIP) e o quarto e último grupo foi composto por pacientes provindos do IMIP negativos para ambos os vírus (controle) de um banco de amostras do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) formado por 45 pacientes. As amostras foram analisadas no LIKA - UFPE.

Cada paciente preencheu um formulário (Anexo A) com questões pertinentes ao trabalho juntamente com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B).

#### ***3.2. COLETA DE AMOSTRAS***

4 ml de amostra de sangue foram coletados em tubo contendo anti-coagulante (EDTA) de pacientes atendidos nos ambulatórios. Em seguida, transportadas em isopor contendo gelo e armazenadas sob refrigeração (4°C) no LIKA para posterior extração de DNA.

#### ***3.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO***

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de sangue periférico anticoagulado com EDTA utilizando o kit comercial Genomic DNA purification kit (PROMEGA-USA).

### **3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

Foram formados 4 grupos de estudos da seguinte maneira: pacientes de ambos os sexos, e na faixa etária entre 15 e 60 anos, com lesões macroscópicas na região anal e perianal, portadores de co-infecção pelos vírus HPV/HIV formaram um dos grupos, os demais, HIV sem co-infecção e HPV sem co-infecção e um grupo controle sem co-infecção.

### **3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

Foram excluídos do estudo pacientes portadores de lesões macroscópicas na região anal e perianal que não apresentem infecção por HIV no grupo HPV/HIV, pacientes que apresentem lesões por HPV no grupo dos pacientes HIV positivo (apenas) e pacientes que apresentem positividade para o vírus do HIV no grupo HPV positivo (apenas).

### **3.6 ANÁLISE DE POLIMORFISMO**

#### **3.6.1 Gene codificador da proteína ligadora de manose (MBL)**

A detecção dos polimorfismos do exon 1 do gene da MBL foi realizada como descrito previamente por ARRAES *et al.*, 2006 e HLADNIK *et al.*, 2002. baseado na curva de “melting temperature assay” usando o Rotor Gene<sup>TM</sup> RG 3000 (Uniscience-Cobert Research –Austrália) como plataforma, bem como primers específicos.

Os SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) do exon 1 analisadas estão disposta nos códons -52, -54 e -57. Os três SNPs foram analisadas no mesmo produto da PCR em tempo real através da curva de dissociação<sup>1</sup> e agrupadas no alelo “O” quando alguma mutação ocorria nos códons como descrito por Madsen *et al.*, 2001. A amplificação do exon 1 da MBL2 foi realizada para um volume final de 25µl com SYBr Green PCR Master Mix 1X (Applied Biosystems-UK),

---

<sup>1</sup> Curva de dissociação se refere ao protocolo da “melting temperature curve assay”.

1,25µM de cada primer (“forward” e “reverse”) e cerca de 200ng do DNA genômico molde. A condição termal da reação iniciou com uma desnaturação a 95°C por 2 min. seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg. e anelamento e extensão a 60°C por 1 min.

Após a amplificação do exon 1, o produto resultante foi submetido ao protocolo da curva de “melting” utilizando o Rotor Gene™ RG 3000 (Uniscience-Cobert Research-Austrália).

Os cálculos referentes a variação da emissão do fluoróforo foram automaticamente realizados pelo software do programa Rotor Gene™ RG 3000 (Uniscience-Cobert Research-Austrália) versão 6.0 (build 41) gerando as curvas de dissociação permitindo a detecção das SNPs. Os controles da PCR em tempo real foram desenhados a partir de amostras previamente seqüenciadas e cedidas pela equipe liderada pelo professor Sergio Crovella (Professor titular do Departamento de Genética da UFPE). Dessa forma conhecendo os genótipos das amostras controles foi possível a genotipagem de amostras desconhecidas. Um controle interno da reação, livre de DNA, foi realizado para avaliar a qualidade e contaminação da reação.

### 3.6.2 Gene da beta defensina humana 1 (HBD-1)

Para analisar o SNP da região 5’UTR do gene HBD-1 foi utilizado e adaptado o protocolo de acordo com Boniotto *et al.*, 2004. Tal protocolo é baseado numa PCR quantitativa em tempo real utilizando hairpin-shaped primers (HP) (Kaboev *et al.*, 2000) “forwards” alelo específico C e G, assim como HP “reverse” comum utilizando Rotor Gene™ RG 3000 (Uniscience-Cobert Research-Austrália) como plataforma.

O SNP analisado consiste numa transversão de C→G na posição -44 da 5’UTR. A mutação dessa região foi categorizada com alelo G, enquanto que o tipo selvagem foi denominado de alelo C. A amplificação da região desta SNP, nas amostras de DNA, foi realizada performando-se duas PCRs em tempo real em paralelo para um volume final de 25µl. De forma que em cada

PCR continha ou o HP-“forward”-C ou -G produzindo um fragmento de 45 pares de base. A PCR continha SYBR Green PCR Master Mix 1x (Applied Biosystem-UK), 1 $\mu$ M de cada primer e aproximadamente 200ng de DNA molde. A termociclagem foi dividida em três estágios: (1 $^{\circ}$ ) 95 $^{\circ}$ C por 10 min., 70 $^{\circ}$ C por 30 seg.; (2 $^{\circ}$ ) 72 $^{\circ}$ C por 30 seg., 95 $^{\circ}$ C por 20 seg., 69 $^{\circ}$ C por 30 seg. (abaixando 1 $^{\circ}$ C a cada ciclo) durante 10 ciclos (3 $^{\circ}$ ) 72 $^{\circ}$ C por 30 seg., 95 $^{\circ}$ C por 20 seg., 60 $^{\circ}$ C por 30 seg. por 40 ciclos, onde a fluorescência foi capturada na última etapa do terceiro estágio. O software do programa Rotor Gene<sup>TM</sup> RG 3000 (Uniscience-Cobert Research-Austrália) versão 6.0 (build 41) realizou os cálculos automaticamente gerando a curva de quantificação necessária para a genotipagem. Os controles da PCR em tempo real foram desenhados a partir de amostras previamente seqüenciadas e cedidas pela equipe liderada pelo professor Sergio Crovella. Um controle interno da reação, livre de DNA, foi realizado para avaliar a qualidade e contaminação da reação.

### ***3.7 ANÁLISE DE DADOS***

O cálculo do  $\chi^2$ , assim como das frequências gênicas, foram feitos manualmente com o auxílio do Microsoft® Office Excel 2003. Para correlacionar as frequências gênicas com o aumento da susceptibilidade ou da resistência à infecção pelo HPV, como também na identificação dos marcadores de risco, foi utilizado o Teste Exato de Fisher, utilizando o programa R (2005; versão 2.1.1; <http://cran.r-project.org/mirrors.html>).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 DETECÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO GENE DA MBL-2

A curva de “melting” realizada após a amplificação do exon 1 da MBL-2 permitiu identificar os três genótipos possíveis. Os genótipos AA obtiveram um pico de melting igual a 83,1 °C ( $\pm 0,1$ ), enquanto que as amostras AO mostraram dois picos com 82,6 °C ( $\pm 0,1$ ) e 80,7 °C ( $\pm 0,1$ ) e um pico para os genótipos OO de 81,7 °C ( $\pm 0,1$ ).

As frequências gênicas e alélicas para o polimorfismo do exon 1 do gene da MBL são mostradas na tabela 3. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas quando comparados os seguintes grupos: pacientes infectados pelo HPV vs pacientes infectados pelo HIV ( $p=0,772$ ); pacientes infectados pelo HPV vs pacientes co-infectados com HPV/HIV ( $p=0,8793$ ); pacientes infectados pelo HPV vs pacientes controle ( $p= 0,918$ ); e pacientes co-infectados com HPV/HIV vs. pacientes controle ( $p=0,9233$ ). Assim como também não houve uma diferença estatística significativa do polimorfismo do exon 1 do gene da MBL entre o grupo HIV positivo e o grupo controle ( $p= 0,7866$ ).

O teste do  $\chi^2$  mostrou que as frequências dos SNPs nos códons -52, -54, -57 do exon 1 ( $\chi^2=0,720$ ) na população infectada pelo HPV estão de acordo com as leis do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

**Tabela 3.** Distribuição das frequências alélicas e genóticas do gene da MBL-2 em pacientes com HPV e controles. Teste exato de Fisher.

<b>Freqüência Genotípica</b>	<b>HPV</b>	<b>HIV</b>	<b>HPV/HIV</b>	<b>Controle</b>
	<b>n=15</b>	<b>n=20</b>	<b>n=18</b>	<b>n=45</b>
			(%)	(%)
<b>AA</b>	<b>0,47 (7/15)</b>	<b>0,5 (10/20)</b>	<b>10 (0,55)</b>	<b>24 (0,53)</b>
<b>A0</b>	<b>0,40 (6/15)</b>	<b>0,45 (9/20)</b>	<b>7 (0,39)</b>	<b>16 (0,36)</b>
<b>00</b>	<b>0,13 (2/15)</b>	<b>0,05 (1/20)</b>	<b>1 (0,06)</b>	<b>5 (0,11)</b>
<b>Freqüência alélica</b>				
<b>A</b>	<b>0,67</b>	<b>0,72</b>	<b>0,75</b>	<b>0,71</b>
<b>0</b>	<b>0,33</b>	<b>0,28</b>	<b>0,25</b>	<b>0,29</b>

\*Valores de p-value:

1-HPV VS HIV	genótipo p= 0.772	alelo p= 0.6099
2-HPV VS HPV/HIV	genótipo p= 0.8793	alelo p= 0.4110
3-HPV VS CONTROLE	genótipo p= 0.918	alelo p= 0.8248
4-HIV VS HPV/HIV	genótipo p= 0.8712	alelo p= 0.7913
5-HIV VS CONTROLE	genótipo p= 0.7866	alelo p=1
6-HPV/HIV VS CONTROLE	genótipo p= 0.9233	alelo p= 0.6549

#### 4.2 $\beta$ -DEFENSINA HUMANA 1

A genotipagem do polimorfismo da  $\beta$ -defensina foi realizada através da curva de quantificação sendo possível detectar os três genótipos possíveis, CC, CG e GG, na posição -44 da região 5'UTR do gene da HBD-1. A genotipagem foi possível pela comparação dos  $C_t$  (Curva threshold) das duas PCR corridas em paralelo. A amostra que obteve o menor  $C_t$  com o primer *WT* foi genotipada como homozigota selvagem (CC). Por outro lado, a curva de quantificação que apresentou menor  $C_t$  com o primer *MT* foi genotipada como homozigota mutante (GG).

Enquanto que as amostras heterozigotas C/G apresentaram  $C_t$  similar em ambas as PCR corridas em paralelo com os primers *WT* e *MT*.

Após a otimização deste protocolo de genotipagem, foi possível determinar as frequências gênicas e alélicas dos grupos em estudo e contrapor seus valores com as do grupo controle previamente genotipados.

As frequências gênicas e alélicas para o polimorfismo -44 do gene da  $\beta$ -defensina são mostradas na tabela 4. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas quando comparados os seguintes grupos: pacientes infectados pelo HPV vs pacientes infectados pelo HIV ( $p= 0.8791$ ); pacientes infectados pelo HPV vs pacientes co-infectados com HPV/HIV ( $p= 0.6286$ ); pacientes infectados pelo HPV vs pacientes controle saudáveis ( $p= 0.1378$ ); e pacientes co-infectados com HPV/HIV vs. pacientes controle  $p= 0.5109$ . Por outro lado, houve uma diferença estatística significativa do polimorfismo na região -44 do gene da  $\beta$ -defensina entre o grupo HIV positivo e o grupo controle ( $p= 0,0052$ ). O alelo G apresentou uma frequência aumentada no grupo infectado pelo vírus do HIV (0,35) quando comparado ao grupo controle (0,14)  $p=0,0030$  (OD 0.313 e IC 95%). Isso significa que os indivíduos que têm o alelo mutante G apresenta um risco de 0.3 vezes maior para o infecção pelo HIV.

O teste do  $\chi^2$  mostrou que as frequências da SNP -44 da HDB-1 ( $\chi^2=0,72$ ) na população infectada pelo HPV estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

**Tabela 4.** Distribuição das frequências alélicas e genótípicas do gene da beta-defensina em pacientes com HPV e controles. Teste exato de fisher

Frequência Genotípica	HPV	HIV	HPV/HIV	Controle
	n=15	n=20	n=18	n=116
CC	0,53 (8/15)	0,4 (8/20)	13 (0,72)	84 (0,73)
CG	0,4 (6/15)	0,5 (10/20)	4 (0,22)	29 (0,25)
GG	0,07 (1/15)	0,1 (2/20)	1 (0,06)	2 (0,02)
Frequência alélica				
C	0,73	0,65	0,83	0,86
G	0,27	0,35	0,17	0,14

\*Valores de p-value:

1 -HPV VS HIV	genótipo p= 0.8791	alelo p= 0.6039
2 -HPV VS HPV/HIV	genótipo p= 0.6286	alelo p= 0.3751
3 -HPV VS CONTROLE	genótipo p= 0.1378	alelo p= 0.1064
4 -HIV VS HPV/HIV	genótipo p= 0.1178	alelo p= 0.1164
5 -HIV VS CONTROLE	genótipo p= 0.0052	alelo p= 0.0030
OD= 0.313 para CI de 95% [0.14 a 0.72]		
6 -HPV/HIV VS CONTROLE	genótipo p= 0.5109	alelo p= 0.7995

OD = odds ratio; CI = confidence intervals

## 5 DISCUSSÃO

A MBL-2 apresenta um papel fundamental na proteção contra uma grande variedade de patógenos (WALLIS, 2003) e diversos estudos mostram que polimorfismos dentro do exon 1 do gene dessa proteína provocam diminuição nos níveis funcionais séricos da mesma (MADSEN, *et al.*, 1994) . No presente trabalho, utilizou-se um protocolo previamente determinado no laboratório para a genotipagem do polimorfismo da HBD-1 e da MBL2 utilizando a tecnologia da curva de quantificação e de “melting”, respectivamente, tendo como base a plataforma da PCR em tempo real. Posteriormente, para a genotipagem da MBL-2 foi utilizado o software da curva de dissociação do Rotor Gene 3000 que permitiu determinar exatamente cada pico (83,1°C; 82,6°C e 80,7°C; 81,7°C; para os genótipos, AA, AO e OO) da temperatura de “melting” com uma alta reprodutibilidade ( $\pm 0,1$ ).

Nossos resultados mostraram que as frequências genótípicas dos polimorfismos no exon 1 da MBL-2 não apresentaram relação com a susceptibilidade à infecção pelo HPV (p value= 0,9233). Estes dados estão de acordo com estudos prévios realizados neste laboratório utilizando amostras de HPV para lesão cervical (Brandão *et al.*, 2007). Steffensen *et al.* (2003) desenvolveram com sucesso um protocolo baseado na temperatura de “melting”, porém utilizaram sondas marcadas com fluorescências aumentando o custo da análise por paciente. Já o experimento de Amoroso *et al.* (1999), realizou uma amplificação isolada do códon -54 e assim como os de Hladnik *et al.* (2002) necessitam de manipulações dos dados para gerar os picos da temperatura de “melting”. Diferentemente dos resultados aqui demonstrados, outros estudos mostraram que em infecções causadas por vírus, tais como, HIV, HCV, HTLV, os polimorfismos no gene da MBL-2 aumentaram significativamente a susceptibilidade à infecções (BONIOTTO, *et al.*, 2000; ARRAES, *et al.*, 2006). Em particular, o vírus da imunodeficiência

humana, apresenta em sua superfície glicoproteínas (gp 120) que contêm a manose, de forma que a MBL possa se ligar a elas e promover a opsonização do HIV e a ativação do sistema complemento (MADSEN, *et al.*, 1994; WALLIS, 2003). Estes papéis da MBL no sistema imune conferem relativa proteção contra o HIV nos estágios iniciais da infecção e SNPs no exon 1 podem ser utilizado como marcadores de risco à infecção. Até a atualidade nenhum experimento foi realizado para demonstrar o padrão de carboidratos presentes na superfície do HPV.

A infecção pelo HPV apresenta um caráter multifatorial incluindo fatores genéticos que atuam interferindo na resposta do indivíduo contra a infecção (TYRING, 2000) a qual mostra um padrão transitório na maioria dos indivíduos (70-90%) que eliminam o vírus espontaneamente num período de 1 a 2 anos. Entretanto, 10% a 30% das infecções pelo vírus se tornam persistentes e progridem para o desenvolvimento do carcinoma (Gonçalves *et al.*, 2004).

Deste ponto, duas idéias centrais podem ser delineadas. Em primeiro lugar, o baixo número do grupo de estudo (n=18) pode mascarar e promover resultados estatisticamente não significativos. Em segundo lugar, a MBL pode apresentar um papel fundamental apenas nos momentos iniciais da infecção, visto que ela atua primordialmente no sistema imune inato permitindo a sua ligação com o adaptativo, onde após o HPV ter burlado o sistema imune a MBL não mais apresentaria um papel tão importante. Para confirmar, seria necessário obter um grupo de estudo formado por indivíduos que tiveram contato com o HPV mais eliminaram o vírus. Em outras palavras, precisa-se voltar também à atenção para 70-90% das pessoas que eliminam o vírus naturalmente.

Não foi verificada associação do polimorfismo do exon 1 do gene da MBL-2 com a infecção pelo HPV também não sendo verificada na co-infecção pelo HIV. Esses resultados não estão de acordo com o encontrado por Arraes *et al.* (2006) que demonstrou associação dos

polimorfismos com a infecção pelo HIV, podendo ter como interferência o pequeno número de amostras.

As defensinas têm fundamental importância na proteção do epitélio e da mucosa do trato genital promovendo uma verdadeira barreira protetora primária contra patógenos (BOMAN, 1999). Contudo, este estudo realizado a partir de amostras do trato anogenital, cuja importância das defensinas ainda não está elucidada, não foi verificada nenhuma associação do polimorfismo com a infecção em questão. Estes dados estão de acordo com Buck *et al.* (2006) que excluíram a HBD-1 da proteção contra a infecção provocada pelo HPV. Seus resultados *in-vitro* mostraram que a HBD-1 não apresentaram atividade antimicrobiana contra ao papilomavírus, alegando pouco ou nenhuma atividade da HBD-1 contra vírus não-envelopados, como é o caso do HPV.

Braida *et al.* (2004) avaliaram o papel de três SNPs na 5'UTR, porém apenas a da posição -44 apresentou diferenças significativas nos pacientes infectados pelo HIV-1. Entretanto, diferentemente, seus resultados mostraram que a principal causa da diferença está nas frequências dos homozigotos CC. Juveric *et al.* (2002) também conclui que existe uma forte associação entre a SNP -44 na proteção contra a *Candida*. Por outro lado, Brandão *et al.* (2007) encontraram associação do polimorfismo da  $\beta$ -defensina com a infecção pelo HPV em lesão cervical.

## **6 CONCLUSÃO**

- Os polimorfismos do gene MBL-2 nos grupos estudados (HIV positivo, HPV positivo, HPV/HIV positivos) não apresentaram correlação com a infecção;
- Os polimorfismos da região -44 do gene HBD-1 não apresentaram associação com a susceptibilidade com as infecções (HPV positivo, HPV/HIV positivos), porém mostrou associação com a infecção pelo HIV.

**REFERÊNCIAS**

ABDEL-HARDY M, BUNN SK . Inflammatory bowel disease . Current Paediatrics; 14(7) : 598-604.2004

AMOROSO et al. Polymorphism at codon 54 of mannose-binding protein gene influences AIDS progression but not HIV infection in exposed children. AIDS. 13(7):863-4. 1999.

ARRAES, L.C.; SOUZA, P.R.E.; BRUNESKA, D.; CASTELO FILHO, A.; DE SOUZA CAVADA, B.; DE LIMA FILHO, J.L. E CROVELLA, S. A cost-effective melting temperature assay for the detection of single-nucleotide polymorphism in the MBL2 gene of HIV-1-infected children. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 39. 2006.

BODAGHI S, YAMANEGI K, XIAO SY, COSTA M, PALEFSKY JM, ZHENG ZM. Colorectal Papillomavirus Infection in Patients with Colorectal cancer. Cli Ca Res. 2005; 11(8) 2862-2867

BOMAN, G.H Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of immunity: an update review. Sacand. J. Immunol.48:15-25 .1998.

BONNIOTTO, M.; HAZBÓN, M.H.; JORDAN, W.J.; LENNON, G.P.; ESKDALE, J.; ALLAND, D. E GALLAGHER, G. Novel Hairpin-Shaped Primer Assay To Study the Association of the-44 Single-Nucleotide Polymorphism of the DEFB1 Gene with Early-Onset Periodontal Disease. Clinic and Diagnostic Laboratory Immunology. 11:766-9. 2004.

BRAIDA, L.; BONNIOTTO, M.; PONTILHO A.; TOVO, P.A.; AMOROSO, A. E CROVELLA, S. A single nucleotide polymorphism in the human beta-defensin 1 gene is associated with HIV-1 infection in Italian children. 18, 1598-1600. 2004.

BRANDÃO et al, Análise de polimorfismos dos genes MBL2 e HBD-1 por PCR em tempo real na infecção pelo papilomavírus humano (HPV), (Trabalho de Conclusão de Curso) Centro de Ciências Biológicas, UFPE- Recife 2007.

BRENNAN, S. E SYRAJANEN, K. Regulation of cell cycles is of key importance in human papillomavirus (HPV)-associated cervical carcinogenesis. São Paulo Medical Journal. 121(3): 128-132. 2003.

BUCK, C.B.; DAY, P.M.; THOMPSON, C.D.; LUBKOWSKI, J.; LU, W.; LOWY, D.R. E SCHILLER, J.T. Human  $\alpha$ -defensins block papillomavirus infection. PNAS. 103(5):1516-21. 2006.

BURD, E.M. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. Clinical Microbiology Reviews. 1-17. 2003.

CASTRO TMPG, NETO CER, SCALA KA, SCALA WA. Manifestações orais associadas ao papilomavírus humano (HPV) conceitos atuais: revisão bibliográfica. Rev. Bras. Otorrinolaringol. 2004; 70(4): 546-550.

CLARKE, B.; CHETTY, R. Cell cycle aberrations in the pathogenesis of squamous cell carcinoma of the uterine cervix . Gynecol . Oncol . 2001; 82(2): 238-246.

DIAZ NJ, PATRICIO FS, FAGUNDES-NETO, U. Colite alérgica: características clínicas e morfológicas da mucosa retal em lactentes com enterrogiã. Arq Gastroenterol. 2002 ; 39(4) : 260-267.

Dork, T.; Stuhmann, M. Polymorphisms of the human  $\beta$ -defensin-1 gene. *Mol. Cell Probes* **12** (1998), pp. 171–173.

FERENCZY, A. E FRANCO, E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol.* 3(1):11-6. 2002

FRISCH M, FENGER C, VAN DER BRULE AJC, SORENSEN P, MEIJER CJLM, WALBOOMERS JMM, ADAMI HO, MELBYE M, GLIMELIUS B. Variants of Squamous Cell Carcinoma of the Anal Canal and Perianal Skin and Their Relation to human Papillomaviruses. *Ca Research.* 1999. 59: 753-757

FRISCH M, GLIMELIUS B, VAN DEN BRULE AJC, WOHLFAHRT J, MEIJER CJLM, WALBOOMERS JMM, GOLDMAN S, SVENSSON C, ADAMI H-O, MELBYE M. Sexually transmitted Infection as a Cause of Anal Cancer. *NEJM.* 1997. 337(19):1350-1658.

GONÇALVES MAG, DONADI EA . Immune cellular response to HPV: Current concepts. *Braz. J. Inf. Dis.* 2004; 8(1): 1-9.

GOSTOUT, B.S.; ZANETTA, G.M; MALEEMONKOL, S.; KAMAT, M.R.; MCGOVERN, R.M. E PERSING, D.H. Differential distribution of sequence variations in HPV-16 E6. *Gynecologic Oncology.* 79:11-17. 1999.

HLADNIK U, BRAIDA L, BONIOTTO M, PIRULLI D, GERIN F, AMOROSO A, CROVELLA S. Single-tube genotyping of MBL-2 polymorphisms using melting temperature analysis. *Clin Exp Med.* 2 (2): 105-8. 2002.

Disponível em <http://www.gineco.com.br/hpvum.htm>, acesso: 21/01/08 às 18:48h

JO H, Kim JW. Implications of HPV infection in uterine cervical cancer. *Ca Therapy* 2005. 3:419-434.

JUVERIC, R.J.; BAI, M.; CHADWICK, R.B.; WHITE, T.C. E DALE, B.A. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in human  $\beta$ -defensin 1: High-throughput SNP assays and association with candida carriage in type I diabetics and nondiabetic controls. *Jornal of Clinical Microbiology*. 41, 90-96. 2003.

KABOEV, O.K.; LUCHKINA, L.A.; TRETIAKOV, A.N. E BAHRMAND, A.R. PCR hot start using primers with the structure of molecular beacons (hairpin-like structure). *Nucleic Acids Res*. 28:e94. 2000.

LAJOUS M, MUELLER N, CRUZ-VALDEZ A, AGUILAR LV, FRANCESCHI S, HERNANDEZ-AVILA M, LAZCANO-PONCE E. Determinants of Prevalence, Acquisition, and Persistence of Human Papillomavirus in Healthy Mexican Military Men. *Ca Epidemiol Biomarkers Prev* 2005. 14 (7): 1710-1716.

LAMBRIS, J.D., RICKLIN, D., GEISBRECHT, B. V.; Complement evasion by human pathogens. *Nature*. 2008. 6: 132-142.

LAMPINEN TM, MILLER ML, CHAN K, ANEMA A, VAN NIEKERK D, SCHILDER AJ, TAYLOR R, HOGG RS. Randomized Clinical Evaluation of Self-Screening for Anal Cancer Precursors in Men Who Have Sex With Men. *Cytojournal*. 2006. 3:4.

LEHNER, T. Innate and adaptive mucosal immunity in protection against HIV infection. *Vaccine*. 21(2):S68-76. 2003.

LEIMAN G. Anal Screening Cytology. *Cytojournal*. 2005. 2:5.

MADSEN, H. O., P. GARRED, ET AL. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics*, 40(1):37-44. 1994.

MAGNADOTTI, B. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol*, v.20, n.2, Feb, p.137-51. 2006.

MANZIONE CR , NADAL SR , CALORE EE . Oncogenicidade do papilomavírus humano e o grau de neoplasia intra-epitelial anal em doentes HIV positivo . *Rev . Assoc. Med Bras . 2004 ; 50 (3) : 282-285 .*

MARTIN F, BOWER M. Anal Intraepithelial Neoplasia in HIV Positive People. *Sex Transm Inf.* 2001. 77: 327-331.

MONTOYAMA, S.; LADINES-LLAVE, C.A.; VILLANUEVA S. E TAKESHI. T.. The role of Human Papilloma Virus in the molecular biology of cervical Carcinogenesis. *J. Med. Sci.* 50:1-19. 2004.

MÜNGER K. BALDWIN A, EDWARDS KM, HAYAKAWA H, NGUYEN CL, OWENS M, GRACE M, HUH KW. Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. *J Virology.* 2004; 78 (21):11451-11460.

NADAL, S.R.; MANZIONE, C.R., *Proctologia na AIDS*, 2007

NONNENMACHER B, BREITENBACH V, VILLA LL, PROLLA JC , BOZZETTI MC. Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. *Rev. Saúde Pública.* 2002; 36 (1): 95 -100.

OLIVEIRA MC , SOARES RC , PINTO LP , COSTA A. HPV e carcinogênese oral ; revisão bibliográfica . Rev . Bras. Otorrinolaringol. 2003 ; 69(4) : 553-559.

PALEFSKY JM , HOLLY EA , GONZÁLES J, LAMBORN K, HOLLANDER H. Detection of human papilomavírus DNA in anal intrapithelial neoplasia and anal cancer . Cancer Res . 1991;51 :114-1019

PALEFSKY JM , HOLLY EA , GONZÁLES J, LAMBORN K, HOLLANDER H. Natural history of anal cytologic abnormalities and papillomavirus infection among homosexual men with group HIV disease. J. AIDS, 1992

PALEFSKY JM. Human Papillomavirus Infection and Anogenital Neoplasia in Human Immunodeficiency Virus-Positive Men and Women. J Nat Ca Inst Monographs. 1998; 23:15-20

RODEN, R.B.S. E WU, T-C. Vaccination to prevent and treat cervical cancer. Human Pathology. 35(8):971-982. 2004.

ROUSSEAU Jr DL, THOMAS Jr CR, PETRELLI NJ, KAHLENBERG MS. Squamous Cell Carcinoma of the Anal Canal. Sur Oncology. 2005. 14: 121-132

SANJOSÉ S; PALEFSKY J. Cervical and anal HPV infections in HIV positive women and men. Virus Res. 2002 ; 89: 201-211.

SERRA S; CHETTY R. Tumours of the anal canal. Current Diag Pathology. 2006; 12: 136-151.

SIERRA, S., B. Kupfer, et al. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J Clin Virol*, 34(4):233-44. 2005.

STANLEY, M. Immune responses to human papillomavirus. *J. Vac.* 5674:1-7. 2005.

STEFFENSEN, R.; HOFFMANN, K.; VARMING, K. Rapid genotyping of MBL2 gene mutations using real-time PCR with fluorescence hybridisation probes *Journal of Immunological Methods*; 278: 191-199. 2003.

[SUN; C.Q.;](#) [ARNOLD, R.;](#) [FERNANDEZ-GOLARZ, .;](#) [PARRISH, A.B.;](#) [ALMEKINDER, T.;](#) [HE, J.;](#) [HO, S.M.;](#) [SVOBODA, P.;](#) [POHL, J.;](#) [MARSHALL, F.F.;](#) [PETROS, J.A.;](#) Human beta-defensin-1, a potential chromosome 8p tumor suppressor: control of transcription and induction of apoptosis in renal cell carcinoma. [Cancer Res. 2007 Jun 15;67\(12\):5997; author reply 5997.](#)

TYRING, S.K.; Human papillomavirus infections: Epidemiology, pathogenesis, and host immune response. *J. Am. Acad. Dermatol.* 43(1):S18-S26. 2000.

WALLIS, R. Structural Basis for Mannose-Binding Protein Function in Innate Immunity. *Immunobiology of Carbohydrates.* 1-12. 2003.

WATSON RA. Human Papillomavirus: Confronting the Epidemic – A Urologist’s Perspective. *Rev Urology.* 2005. 7(3):135-144.

WORLD HEALTH ORGANIZATION CLASSIFICATION OF TUMOURS. Pathology and genetics. Tumours of the Digestive System.. 2000. 147-155

Disponível

em

[www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/fragments/fragments.cgi?db=genome&gi=10337](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/fragments/fragments.cgi?db=genome&gi=10337). Acesso: 06/06/2008 às 18:48h.

XI LF , CRITCHLOW CW , WHELLER CM , KOUTSKY LA. Risk of anal carcinoma in situ in relation to human papillomavirus type 16 variants . Cancer Res. 1998 ; 58 :3839-3844

ZHENG, ZHI-MING E BAKER, CARL C. Papillomavirus Genome Structure, Expression, and Post-Transcriptional Regulation. National Institute of health. 11: 2286-2302. 2006.

ZIMMERMMANN, J.B.; MELO, V.H.; CASTRO, L.P.F.; ALVES, M.J.M.; ZIMMERMMANN, S.G.; CASTILLO, D.M. Associação entre a contagem de linfócitos T CD4+ e a gravidade da neoplasia intra-epitelial cervical diagnosticada pela histopatologia em mulheres infectadas pelo HIV. Rev. Bras. Ginecol. Obstet. v.28 n.6 Rio de Janeiro jun. 2006.

zur HAUSEN, H. Condylomata acuminata and human genital cancer. Cancer res. 36. 530. 1976.

# **ANEXOS**

**ANEXO 01 QUESTIONÁRIO**

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

**PESQUISA HPV**

Ficha n°: \_\_\_\_\_ Prontuário: \_\_\_\_\_

**Dados pessoais**

Nome: \_\_\_\_\_  
 Data Nasc.: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_  
 Nome do Pai: \_\_\_\_\_  
 Nome da Mãe: \_\_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_  
 Naturalidade: \_\_\_\_\_ Zona: ( ) Urbana ( ) Rural  
 Escolaridade: \_\_\_\_\_ Raça: \_\_\_\_\_  
 Estado Civil: \_\_\_\_\_

**Fatores Interferentes**

Idade da 1º Relação Sexual: \_\_\_\_\_ Vida Sexual Ativa: ( ) Sim ( ) Não  
 N° de Parceiros: \_\_\_\_\_ Histórico de MSM: \_\_\_\_\_  
 N° de Gestações: \_\_\_\_\_ N° de Partos: \_\_\_\_\_  
 Outras IST: ( ) HIV ( ) Hep.B ( ) Sífilis ( ) Outros: \_\_\_\_\_  
 Tabagismo: ( ) Não ( ) Sim ( ) Ex-fumante  
 Renda Familiar: Salários mínimos: \_\_\_\_\_ Pessoas na Casa: \_\_\_\_\_  
 Uso de Medicação: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**Tipo de Lesão**

( ) Lesão Precursora Tipo: \_\_\_\_\_  
 ( ) Câncer Tipo: \_\_\_\_\_

Localização da Lesão: ( ) Canal Uretral ( ) Canal Anal ( ) Região Perianal

Diagnóstico Histológico:

(1) \_\_\_\_\_  
 (2) \_\_\_\_\_

**Tratamento**

( ) ATA ( ) Podofilina ( ) Exerece ( ) Eletrocauterização  
 ( ) QT ( ) RT ( ) Cirúrgico Tipo: \_\_\_\_\_  
 ( ) Outros: \_\_\_\_\_

**Dados Laboratoriais**

Tipagem do HPV: ( ) Ausente  
 ( ) Alto Grau Tipo \_\_\_\_\_ ( ) Baixo Grau Tipo \_\_\_\_\_

**ANEXO 02 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
Comitê de Ética em Pesquisa

---

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado a participar da pesquisa intitulada, “ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES MBL E  $\beta$ -DEFENSINA COM A INFECÇÃO PELO HPV E/OU HIV EM REGIÃO ANAL E PERIANAL”. O HPV pertence a grupo de vírus que são agentes causadores de lesões ( feridas ) na pele e mucosas (revestimento interno do corpo) de humanos, levando à formação de tumores, podendo infectar várias partes do corpo como boca, esôfago ( garganta ), pênis ( órgão sexual masculino ) e trato anogenital ( ânus/reto), assim justificando a relevância da pesquisa. Sua contribuição consiste na doação de sangue venoso para diagnósticos laboratoriais, a fim de que o seu perfil genético (extração de DNA/RNA) seja determinado, visando identificar uma possível predisposição para infecção pelo HPV. Diante desse contexto, um membro da equipe de pesquisa encontra-se a disposição para fornecer todas as informações adicionais que julgares necessárias para seu melhor entendimento, tais como: coleta da amostra (cuidados pré e pós-coleta) e os critérios de biossegurança, em relação à sua pessoa e amostra a ser obtida.

Sendo assim, a retirada de sangue venoso e análise das amostras, serão realizadas por uma pessoa treinada, com material descartável, quando poderá haver um leve mal-estar, em decorrência de um possível estado prévio de jejum e/ou emocional, como pode ocorrer em quaisquer coletas de sangue. As amostras coletadas serão estocadas para posteriores pesquisas, embora sua identidade seja mantida em sigilo. As informações obtidas e alcançadas com esta pesquisa serão evidenciadas em eventos e publicações científicas.

Os objetivos BENEFICIÁRIOS principais deste estudo constituem o desenvolvimento de métodos de diagnóstico precoce, rápido, eficiente e de baixo custo para doenças neoplásicas, bem como, a formulação de novos produtos terapêuticos mais específicos e com reduzidos efeitos colaterais para pacientes portadores do vírus. Os RISCOS, considerados normais, relacionados com sua participação, são aqueles inerentes aos procedimentos de exames proctológicos já realizados independentes de sua participação na pesquisa citada, tais como: leve dor e desconforto no momento da coleta, os quais serão minimizados tendo em vista a habilidade do profissional a realizá-lo, sendo assim não prejudiciais à integridade da sua saúde.

Este consentimento poderá ser recusado ou retirado em qualquer momento da investigação, sem qualquer penalização, caso os dados citados acima não forem tecnicamente e eticamente adotados.

A participação nesta pesquisa transcorrerá sem que haja recebimento de prêmio ou remuneração.

Eu, \_\_\_\_\_, RG nº \_\_\_\_\_ UF \_\_\_\_\_, sexo \_\_\_\_\_, nascido ao dia \_\_\_\_\_ autorizo e declaro, outrossim, que acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li, ou que foram lidas para mim, e consinto voluntariamente em participar desta pesquisa, guardando em minha posse uma cópia deste TCLE.

Recife, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do paciente

Endereço: \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_

Testemunha 1: \_\_\_\_\_

Testemunha 2: \_\_\_\_\_

Pesquisadora: \_\_\_\_\_

Pesquisadora Suany Mirella de Mattos Melo.

Rua Mauricéia, 233, Iputinga – Recife – PE. Fone:81-91722784.