

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

ANA PAVLA ALMEIDA DINIZ GURGEL

**Análise de variabilidade genética do gene L1 e da região longa
de controle (LCR) dos Papilomavírus humano (HPVs)
circulantes da Região Nordeste do Brasil**

Recife

2015

ANA PAVLA ALMEIDA DINIZ GURGEL

Análise de variabilidade genética do gene L1 e da região longa de controle (LCR) dos Papilomavírus humano (HPVs) circulantes da Região Nordeste do Brasil

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Doutor em Inovação Terapêutica

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas

Co-orientador(a): Prof(a). Dra. Maria Tereza Cartaxo Muniz

Recife

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Gurgel, Ana Pavla Almeida Diniz

Análise de variabilidade genética do gene L1 e da região longa de controle (LCR) dos Papilomavírus humano (HPVs) circulantes da Região Nordeste do Brasil/ Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel– Recife: O Autor, 2015.

145 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas

Coorientadora: Maria Tereza Cartaxo Muniz

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas. Inovação Terapêutica, 2015.

Inclui bibliografia e anexo

- 1. Papilomavírus 2. Vírus- genética 3. Brasil, Nordeste I. Freitas, Antonio Carlos de (orientador) II. Muniz, Maria Tereza Cartaxo (coorientadora) III. Título**

579.2445

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015- 226

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR(A)

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR(A)

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR(A) PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

DIRETOR(A) DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof(a). Dra. Maria Eduarda Lacerda de Larrazábal

VICE- DIRETOR(A) DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof(a). Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

COORDENADOR(A) DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

VICE- COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: GURGEL, Ana Pavla Almeida Diniz

Título: Análise de variabilidade genética do gene L1 e da região longa de controle (LCR) dos Papilomavírus humano (HPVs) circulantes da Região Nordeste do Brasil

Tese apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 25/02/2015

Banca Examinadora

Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Prof. Dr. André Luiz Santos de Jesus

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Prof. Dr. Antonio Roberto Lucena de Araújo

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Prof(a). Dra. Claudia Esther Alicia Rocio Hassan

Instituição: Instituto Nacional do Câncer

Assinatura: _____

À minha Mãe, que lutou incansavelmente para eu chegar onde cheguei;

À Fernando Matos, que SEMPRE está presente, me apoiando em tudo;

À Catarina, minha princesinha.

Às pacientes portadoras do HPV.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por permitir mais uma vitória;

À minha família, **Fernando Matos** e **Catarina Gurgel Matos**, por tanto amor, cuidado, compreensão e incentivo todos os dias;

À minha Mãe (**Maria de Fátima Diniz**, *in memoriam*) e ao meu Pai (**Júnior Gurgel**) pelo apoio, incentivo e por acreditarem em mim;

Às minhas irmãs e sobrinhos, **Valéria Gurgel**, **Vanessa Gurgel**, **Bárbara Gurgel** e **Breno Gurgel**, pelo apoio e carinho;

Ao **Dr. Antonio Carlos de Freitas** (Orientador) pelas oportunidades ofertadas, pela paciência, pela confiança depositada em mim e pelas inestimáveis contribuições acadêmicas;

À **Dra. Maria Tereza Cartaxo Muniz** (Co-orientadora), pelo grande apoio na condução deste estudo;

Ao **Dr. Jacinto da Costa Silva Neto**, pela disponibilidade e apoio essencial no desenvolvimento deste estudo;

À amiga **Angélica Ramos**, pela amizade de longa data e por ter me indicado para trabalhar no LEMTE;

À **Jackeline Silva**, **Carol Medeiros**, **Sinara** e **Isadora Quitans** pela convivência em Recife;

À **André Jesus**, pelas incontáveis ajudas acadêmicas.

À **Bárbara Simas Chagas** e **Kamylla Conceição**, pela parceria acadêmica;

À **Heide Lacerda**, pela grande colaboração no sequenciamento das amostras;

Aos amigos do LEMTE: **Eliane, Luciana, Filipe (Los), Marcelo, Rita, Elyda, Nayara, Biança, Marcos Vinícius, Janaine, Lígia, Cybelle** (*in memoriam*), **Karen, Karin, Anna Jéssica e Breno**, pela ótima convivência no laboratório;

Às médicas ginecologistas **Dra. Eugênia Albuquerque** (Hospital Universitário Oswaldo Cruz) e **Dra. Ivi Serra** (Centro de Medicina Integrada de Sergipe) pela ajuda na coleta das amostras;

Ao **Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica** (PPGIT);

À **Suely Galdino** (*in memoriam*) pela determinação e pelo exemplo acadêmico a ser seguido;

À **Paulo Germano** (PPGIT), pelas inestimáveis ajudas com a burocracia acadêmica;

Aos órgãos de fomento: **Reuni, Capes e CNPq**, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE TABELAS	XIV
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS	XV
LISTA DE ARTIGOS PUBLICADOS/ACEITOS	XVIII
LISTA DE ARTIGOS SUBMETIDOS	XX
LISTA DE CAPÍTULO DE LIVROS PUBLICADOS	XXI
1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1. Papilomavírus (PVs)	24
2.1.1. Breve histórico	24
2.1.2 Morfologia e organização genômica	25
2.1.3 Taxonomia	25
2.1.4 Gênero <i>Alphapapilomavírus</i>	29
2.2. O papilomavírus humano (HPV)	30
2.2.1 Organização do genoma viral	32
2.2.2 Entrada do HPV na célula da camada basal	32
2.2.3 Replicação viral	33
2.2.4 O papel do gene E1	35
2.2.5 O papel do gene E2	36
2.2.6 O papel do gene E4	36
2.2.7 O papel dos oncogenes E5, E6 e E7	38
2.2.8 Os genes L1 e L2	41
2.2.9 NCR e LCR	43
2.2.10 Integração do genoma viral ao genoma do hospedeiro	44
2.3. Infecções por HPV como um importante cofator para o câncer	45
2.3.1 O câncer cervical	47
2.3.2 Principais tipos de HPVs envolvidos na carcinogênese cervical	48
2.3.3 Vacinas profiláticas contra o HPV	49
2.3.4 Cofatores envolvidos na carcinogênese cervical	50

2.3.5 Variantes dos HPVs	50
2.3.5.1 Heterogeneidade genética do HPV16	52
2.3.5.2 Heterogeneidade genética do HPV18	54
2.3.5.3 Heterogeneidade genética do HPV31	55
2.3.5.4 Heterogeneidade genética do HPV33	56
2.3.5.5 Heterogeneidade genética do HPV58	57
3. OBJETIVOS	59
3.1 Objetivo Geral	59
3.2 Objetivos Específicos	61
4. MATERIAL E MÉTODOS	61
4.1. População de estudo	61
4.2. Critérios de elegibilidade	61
4.3. Entrevista	62
4.4. Citologia oncótica da cérvix	62
4.5. Extração do DNA viral	63
4.6. Detecção do DNA do HPV	64
4.7. Genotipagem do HPV	65
4.8. PCR tipo-específica	68
4.9. Análise de variabilidade genética de L1	68
4.10. Análise de variabilidade genética da LCR	68
4.11. Análise das sequências de DNAs obtidas	68
4.12. Análise filogenética	71
4.13. Predição de epítomos de células B e T	72
4.14. Predição dos sítios de ligação dos fatores transcricionais	72
4.15. Análise de associação entre os marcadores virais do HPV16 e as lesões cervicais	73
4.16. Análise estatística	73
4.17. Considerações éticas	74
5. RESULTADOS	75
5.1. Características da população estudada	76
5.2. Resultados da citologia oncótica	76
5.3. Prevalência de infecção genital por HPV	76
5.4. Análise de variabilidade genética do gene L1 de onze genótipos de	80

HPVs	
5.4.1. Gene L1 do HPV16	81
5.4.2. Gene L1 do HPV31	81
5.4.3. Gene L1 do HPV53	86
5.4.4. Gene L1 do HPV54	87
5.4.5. Gene L1 do HPV56	88
5.4.6. Gene L1 dos HPV58	88
5.4.7. Gene L1 do HPV61	92
5.4.8. Gene L1 do HPV62	92
5.4.9. Gene L1 do HPV66	94
5.4.10. Gene L1 do HPV70	94
5.4.11. Gene L1 do HPV81	95
5.5. Análise de variabilidade genética da LCR dos HPV's 16, 31 e 58	95
5.5.1. LCR do HPV16	96
5.5.2. LCR do HPV31	98
5.5.3. LCR do HPV58	99
5.6. Análise Filogenética dos HPV's 16, 31 e 58	101
5.6.1. HPV16	101
5.6.2. HPV31	102
5.6.3. HPV58	103
5.7. Análise de associação entre marcadores do HPV16 e a susceptibilidade para lesões cervicais	104
5.7.1. Polimorfismos do gene L1 do HPV16	104
6. DISCUSSÃO	111
6.1. Principais tipos de HPV's encontrados no Nordeste Brasileiro	111
6.2. Estudo de variabilidade genética	114
6.2.1. Estudo de variabilidade genética do gene L1	115
6.3. Variabilidade da LCR	117
6.4. Análise filogenética	120
6.5. Análise de associação dos polimorfismos virais com o risco do desenvolvimento de lesões cervicais	122
7. CONCLUSÕES	124
8. BIBLIOGRAFIA	125

RESUMO

GURGEL, Ana Pavla Almeida Diniz. **Análise de variabilidade genética do gene L1 e da região longa de controle (LCR) dos Papilomavírus Humano (HPVs) circulantes da Região Nordeste do Brasil.** 2014. 138 f. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Cerca de 265 mil mulheres morrem todos os anos vítimas de câncer cervical. Infecções persistentes causadas por Papilomavírus humano de alto risco oncogênico (HR HPVs) é uma condição necessária, porém não suficiente para o desenvolvimento de lesões cervicais e câncer cervical. Dessa forma, diversos fatores ambientais e genéticos estão envolvidos na carcinogênese cervical. Dentre os fatores genéticos, as variantes genéticas dos HR HPVs parecem estar relacionados com o risco de infecções persistentes e desenvolvimento de lesões e câncer cervical. Assim, o presente estudo investigou: 1) A variabilidade genética de um fragmento do gene L1 dos HPV16, 31, 53, 54, 56, 58, 61, 62, 66, 70 e 81 em amostras biológicas de pacientes oriundos dos Estados de Pernambuco, Alagoas e Sergipe, Nordeste do Brasil; 2) A variabilidade genética da LCR dos HR HPVs 16, 31 e 58 oriundas de pacientes dos Estados de Pernambuco, Alagoas e Sergipe, Nordeste do Brasil; 3) Uma possível associação entre os polimorfismos virais do gene L1 e o risco para desenvolver lesões cervicais nas pacientes do Nordeste do Brasil. Para tanto, a detecção do DNA viral foi realizada em amostras biológicas de 784 pacientes. Os fragmentos parciais do gene L1 e da LCR dos HPVs mencionados foram sequenciados. Análises *in silico* de possíveis epitopos de células B e de células T foram efetuadas nas regiões de mutação não-sinônima no gene L1. Além disso, análises *in silico* dos sítios de ligação dos fatores transcricionais foram realizadas em regiões de alteração nucleotídica da LCR. Foram detectados 23 tipos de HPVs: HPVs 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 53, 54, 56, 58, 61, 62, 66, 70, 72, 81, 82, 83 e 84. Com relação ao gene L1 dos HPV analisados, foram detectadas 98 mutações, sendo 96/98 substituições de bases, 1/98 deleção e 1/98 inserção de nucleotídeo. Dentre estas alterações nucleotídicas no gene L1, 29,6% são mutações não sinônimas. Ademais, 18,36% das variações detectadas no gene L1 estavam inseridas em epitopos de células B, 25,5% inseridos em regiões de MHC Classe I e 18,36% inseridos em regiões de MHC Classe II. Um total de 8,1% das variações genéticas observadas no gene L1 dos HPV estudados foram descritos pela primeira vez na literatura. Em relação a LCR, foram detectadas 95 mutações, sendo 88/95 substituições de bases, 5/98 deleções e 2/95 inserções de nucleotídeos. Um total de 51,5% das mutações detectadas estão inseridas em sítios de ligação dos fatores transcricional celular e/ou viral. Além disso, 3,1% das variações genéticas encontradas na LCR foram descritas pela primeira vez na literatura. As análises filogenéticas mostraram a presença das variantes A e D do HPV16, A e C do HPV31 e A, B, C e D do HPV58 circulante no Nordeste do Brasil. Com relação a repercussão biológica das mutações do gene L1 do HPV16, não foram observadas associações significativas ($p>0.05$) entre os polimorfismos do gene L1 e o risco para desenvolver lesões cervicais. Entretanto, a combinação de determinados alelos destes polimorfismos virais está fortemente associada com o risco de desenvolver lesão cervical. Assim, a detecção das principais variantes e de alterações nucleotídicas com potencial impacto biológico circulantes no Nordeste Brasileiro é importante face as diferenças na patogenicidade dos HPVs.

PALAVRAS-CHAVE: Papilomavírus Humano (HPV). Variabilidade genética. Gene L1. Longa Região de Controle (LCR). Polimorfismos virais.

ABSTRACT

GURGEL, Ana Pavla Almeida Diniz. **Análise de variabilidade genética do gene L1 e da região longa de controle (LCR) dos Papilomavírus Humano (HPVs) circulantes da Região Nordeste do Brasil.** 2014. 138 f.. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Approximately 265 thousand women die every year from cervical cancer. Persistent infections caused by high oncogenic risk Human papillomavirus (HR HPV) are necessary but not sufficient condition for the development of cervical lesions and cervical cancer. Therefore, several environmental and genetic factors are involved in cervical carcinogenesis. Concerning the genetic factors, variants of HR HPV seem to be related to the risk of persistent infections and the development of lesions and cervical cancer. In this sense, the present study aimed to investigate: 1) The genetic variability of a L1 gene fragment from HPV16, 31, 53, 54, 56, 58, 61, 62, 66, 70 and 81 in biological samples of patients from Pernambuco, Alagoas and Sergipe states, Northeastern Brazil; 2) The genetic variability of the LCR of HR HPVs 16, 31 and 58 of patients from Pernambuco, Alagoas and Sergipe states, Northeastern Brazil; 3) Possible association between the viral polymorphisms of the L1 gene and the risk to develop cervical lesions in patients from the Brazilian Northeast. To achieve that, viral DNA detection was performed in biological samples from 784 patients. Partial fragments of the L1 gene and the LCR of the abovementioned HPVs were sequenced. In silico predictions of possible B cells and T cells epitopes were performed in regions of non-synonymous mutation of the L1 gene. Moreover, in silico predictions of the binding sites of transcriptional factors were performed in nucleotide change regions within LCR. Twenty-three HPV types were detected: HPVs 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 53, 54, 56, 58, 61, 62, 66, 70, 72, 81, 82, 83 e 84. Regarding the L1 gene from the analyzed HPVs, 98 mutations were detected, in which 96 are nucleotide substitutions, 1 is deletion and 1 is nucleotide insertion. Among these nucleotide changes in the L1 gene, 29.6% are non-synonymous mutations. Moreover, 18.36% of the nucleotide changes are located in B cell epitopes, 25.5% located in MHC Class I regions and 18.36% located in MHC Class II regions. Finally, 8.1% of the genetic variations in the L1 gene of the studied HPVs were observed for the first time. Concerning LCR, 95 mutations were detected, in which 88 are nucleotide substitutions, 5 are deletions and 2 are nucleotide insertions. A total of 51.5% of the detected mutations are located in binding sites of cellular and/or viral transcriptional factors. Additionally, 3.1% of the genetic variations found in LCR were described for the first time. Phylogenetic analysis showed the presence of A and D variants of the HPV16, A and C variants of the HPV31, and A, B, C and D variants of the HPV58 circulating in the Brazilian Northeast. In regard to the biological repercussion of the L1 gene mutations of the HPV16, no significant associations were observed ($p>0.05$) between L1 gene polymorphism and the risk to develop cervical lesions. However, the combination of certain alleles from these viral polymorphisms is firmly associated to the risk to develop cervical lesion. Thus, the detection of the main circulating variants with potential biological impact in the Brazilian Northeast is important in view of the differences in the pathogenicity of the HPV.

KEYWORDS: Papilomavírus Humano (HPV). Genetic variability. L1 gene. Long Control Region (LCR). Virais polymorphisms.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Árvore filogenética mostrando os trinta e sete gêneros de PVs, baseadas no sequenciamento e alinhamento dos genes E1, E2, L1 e L2 de 241 PVs	28
Figura 2: Árvore filogenética mostrando as espécies dos Alpha-PVs, baseadas no sequenciamento do gene L1	30
Figura 3: Representação esquemática do genoma viral do HPV16	31
Figura 4: Ciclo da infecção viral do HPV	34
Figura 5: Replicação do DNA viral	35
Figura 6: Alvos celulares da proteína E5 durante a carcinogênese	37
Figura 7: Alvos celulares da proteína E6 durante a carcinogênese	38
Figura 8: Alvos celulares da proteína E7 durante a carcinogênese	40
Figura 9: Representação esquemática da LCR do HPV16	43
Figura 10: Número de casos de câncer em diversos sítios genital e não genital	45
Figura 11: Incidência dos casos de câncer cervical em todo o mundo	46
Figura 12: Genoma do HPV, no formato linear	58
Figura 13: Prevalência do DNA do HPV em 784 amostras cervicais oriundas da região Nordeste do Brasil	76
Figura 14: Prevalência de infecções únicas e multiplas em 224 pacientes oriundas da região Nordeste do Brasil	77
Figura 15: Distribuição dos HPVs encontrados na Região Nordeste do Brasil, em uma população de 784 pacientes	78
Figura 16: Distribuição das espécies de Alpha-PVs encontrados na Região Nordeste do Brasil, em uma população de 784 pacientes	80
Figura 17: Análise filogenética do HPV16	101
Figura 18: Análise filogenética do HPV31	102
Figura 19: Análise filogenética do HPV58	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos primers utilizados para a amplificação do gene L1 e da LCR dos HPVs 16, 18, 31, 33 e 58	64
Tabela 2. Sequências de referências utilizadas para a construção das árvores filogenéticas dos HPVs 16, 31 e 58 circulantes no Nordeste do Brasil.	70
Tabela 3. Distribuição das 784 pacientes de acordo com o uso de anticoncepcional, número de parceiros e histórico de DSTs	75
Tabela 4: Frequência dos HPVs encontrados na Região Nordeste do Brasil, em uma população de 784 pacientes	78
Tabela 5: Variações nucleotídicas do gene L1 do HPV16.	83
Tabela 6: Variações nucleotídicas do gene L1 do HPV31	85
Tabela 7: Variações nucleotídicas do gene L1 do HPV53	86
Tabela 8: Variações nucleotídicas do gene L1 do HPV54	87
Tabela 9: Variações nucleotídicas do gene L1 do HPV58	88
Tabela 10: Variações nucleotídicas do gene L1 do HPV62	93
Tabela 11: Variações nucleotídicas do gene L1 do HPV70	94
Tabela 12: Análise de variabilidade genética da LCR do HPV16 comparada à sequência protótipo K02718.1	96
Tabela 13: Análise de variabilidade da sequência nucleotídica da LCR do HPV31 em comparação com a sequência protótipo J04353.1	98
Tabela 14: Análise de variabilidade genética da LCR do HPV58 comparado à sequência protótipo D90400.1	99
Tabela 15: Frequência dos alelos dos polimorfismos virais A6697C, G6723A, A6805T, C6856T e C6862T encontrados no gene L1 do HPV16	105
Tabela 16: Análise de associação entre combinações de alelos dos polimorfismos virais encontrados no gene L1 do HPV16 e a susceptibilidade para as lesões cervicais	106

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

AA	Variante Asiático-Americano
Af-1	Variante Africano 1
Af-2	Variante Africano 2
AGUS	Células glandulares atípicas de significado indeterminado
AP-1	Proteína Ativadora 1
As	Variante Asiático
ASCUS	Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BPV	Papilomavírus bovino
CDK	Quinase dependente de ciclina
C/EBP	Proteína de ligação à sequência CCAAT
CMPVI	Chelonia mydas Papillomavirus type I
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPVI	Canine Papillomavirus type I
CRPV	Cottontail Rabbit Papillomavirus
EV	Epidermoplasia verruciforme
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
FAAD	Domínio de morte associado a proteína Fas
FDA	Food Drug Administration
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígeno leucocitário humano
HPSG	Heparan sulfato proteoglicano
HPV	Papilomavírus humano
HR	Papilomavírus humano de alto risco oncogênico

HSIL	Lesão intraepitelial de alto grau
hTERT	Telomerase reverse transcriptase
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IL-10	Interleucina 10
LCR	Longa região de controle
LSIL	Lesão intraepitelial de baixo grau
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MMP9	Matriz metaloproteinase 9
NCR1	Região não codificante 1
NCR2	Região não codificante 2
NIC	Neoplasia intra-epitelial cervical
NF-1	Fator nuclear 1
OCT-1	Fator de ligação a octâmero
OR	Odds Ratio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação de cadeia de polymerase
PPGIT	Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica
PVs	Papilomavírus
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
SIL	Lesão intraepitelial escamosa
TNF	Fator de necrose tumoral

TRADD	Receptor do fator de necrose tumoral tipo I associado com o domínio de morte
VLPs	Partículas semelhantes a vírus
YY1	Fator yin-yang

LISTA DE ARTIGOS PUBLICADOS/ACEITOS

GURGEL, Ana Pavla Almeida Diniz; CHAGAS, Bárbara Simas; AMARAL, Carolina Maria Medeiros; NASCIMENTO, Kamylla Gomes Conceição; LEAL, Lígia Rosa Sales; SILVA NETO, Jacinto da Costa ; MUNIZ, Maria Tereza Cartaxo; FREITAS, Antonio Carlos. Prevalence of Human papillomavirus (HPV) variants and genetic diversity in the L1 gene and Long Control Region (LCR) of HPV16, 31 and 58 found in North-East Brazil. In *BioMed Research International*, 2014 (Aceito).

AMARAL, Carolina Maria Medeiros; CETKOVSKÁ, Katerina ; **GURGEL, Ana Pavla Almeida Diniz;** CARDOSO, Marcus Vinícius; CHAGAS, Bárbara Simas; PAIVA JÚNIOR, Sérgio; LIMA, Rita; SILVA NETO, Jacinto da Costa ; SILVA, Luiz Antonio Ferreira; MUNIZ, Maria Tereza Cartaxo; BALBINO, Valdir; FREITAS, Antonio Carlos. MDM2 polymorphism associated with the development of cervical lesions in women infected with Human papillomavirus and using of oral contraceptives. *Infectious Agents and Cancer*, v. 9, p. 24, 2014.

SILVA, Maria Angélica Ramos; SILVA, Elen Cristina; **GURGEL, Ana Pavla Almeida Diniz;** NASCIMENTO, Kamylla Gomes Conceição; FREITAS, Antonio Carlos. Bovine papillomavirus E2 and E5 gene expression in sperm cells of healthy bulls. *INDIAN J VIROL*, v. 25, p. 125-128, 2014.

CHAGAS, Bárbara Simas; **GURGEL, Ana Pavla Almeida Diniz;** DA CRUZ, Heide Lacerda Alves; AMARAL, Carolina Maria Medeiros; CARDOSO, Marcus Vinícius; SILVA NETO, Jacinto da Costa; SILVA, Luiz Antonio Ferreira; ALBUQUERQUE, Eugênia Maria Bezerra; MUNIZ, Maria Tereza Cartaxo; FREITAS, Antonio Carlos . An interleukin-10 gene polymorphism associated with the development of cervical lesions in women infected with Human Papillomavirus and using oral contraceptives. *Infection, Genetics and Evolution (Print)*, v. 19, p. 32-37, 2013.

DA SILVA FILHO, Benísio; **GURGEL, Ana Pavla Almeida Diniz;** NETO, Manoel Álvaro; DE AZEVEDO, Dalmo; FREITAS, Antonio Carlos; SILVA NETO, Jacinto da Costa; SILVA, Luiz Antonio Ferreira. Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker of colorectal cancer. *Journal of Clinical Pathology*, v. 66, p. 775, 2013.

GURGEL, Ana Pavla Almeida Diniz ; CHAGAS, Bárbara Simas; AMARAL, Carolina Maria Medeiros; ALBUQUERQUE, Eugênia Maria Bezerra; SERRA, Ivi Gonçalves Santos; SILVA NETO, Jacinto da Costa ; MUNIZ, Maria Tereza Cartaxo; FREITAS, Antonio Carlos. Prevalence and Genetic Variability in Capsid L1 Gene of Rare Human Papillomaviruses (HPV) Found in Cervical Lesions of Women from North-East Brazil. *BioMed Research International*, v. 2013, p. 1-7, 2013.

CHAGAS, Bárbara Simas; BATISTA, Marcus Vinícius de Aragão; CROVELLA, Sergio ; **GURGEL, Ana Pavla Almeida Diniz;** SILVA NETO, Jacinto da Costa; SERRA, Ivi Gonlaves Soares; AMARAL, Carolina Maria Medeiros; BALBINO, Valdir Queiroz ; MUNIZ, Maria Tereza Cartaxo ; FREITAS, Antonio Carlos . Novel E6 and E7 oncogenes variants of human papillomavirus type 31 in Brazilian women with abnormal cervical cytology. *Infection, Genetics and Evolution (Print)*, v. 16, p. 13-18, 2013.

FREITAS, Antonio Carlos; **GURGEL, Ana Pavla Almeida Diniz**; CHAGAS, Bárbara Simas; COIMBRA, Eliane ; AMARAL, Carolina Maria Medeiros. Susceptibility to cervical cancer: An overview. *Gynecologic Oncology (Print)*, v. 126, p. 304-311, 2012.

LIMA, Cynthia Pontes; Soares, Renata; Bastos, ISLA; Grangeiro, Ana Ruth; **Gurgel, Ana Pavla Almeida Diniz**; Silva, Aldo César; Silva, Jackeline Gomes; Oliveira, Rinalda Araújo; Souza, Ivone Antonia. Evaluation of acute toxicity of the *Pithecellobium cochliocarpum* (Gomez) Macbr bark extract. *Rev. Bras. Plantas Med*, 16. Dezembro de 2014.

CHAGAS, Bárbara Simas; Comar, Manola; **Gurgel, Ana Pavla Almeida Diniz**; Paiva, Sérgio; Seraceni, Silva; Freitas, Antonio Carlos; Crovella, Sergio. Risk of developing cervical lesions in women infected with single or multiple non-vaccine Human papillomavirus (HPV). Artigo submetido para PlosOne (Submetido).

LISTA DE CAPÍTULO DE LIVROS PUBLICADOS

FREITAS, Antonio Carlos; **GURGEL, Ana Pavla Almeida Diniz**; CHAGAS, Bárbara Simas, AMARAL, Carolina Maria Medeiros; COIMBRA, Eliane Campos; LIMA, Élyda Gonçalves; SILVA NETO, Jacinto da Costa; LEITÃO, Maria da Conceição Gomes; LIMA, Rita de Cássia Pereira. Human papillomavirus-related cancers. *Infection and Cancer*. Editora. Springer (Aceito para publicação).

FREITAS, Antonio Carlos; JESUS, André Luiz Santos; **GURGEL, Ana Pavla Almeida Diniz**; SILVA, Maria Angélica Ramos. Advances in Viral Genome Research of Papillomavirus. *Advances in Viral Genomes Research*. Nova Science Publishers, 10 ed., 2013, p. 25-.

FREITAS, Antonio Carlos; **GURGEL, Ana Pavla Almeida Diniz**; CHAGAS, Bárbara Simas; SILVA NETO, Jacinto da Costa. Cervical Cancer: A Cytological and Molecular Overview. *Cervical Cancer: Screening Methods, Risk Factors and Treatment Options*, Nova Science Publishers, 8ed, 2013, p. 1-30.

FREITAS, Antonio Carlos; **GURGEL, Ana Pavla Almeida Diniz**; CHAGAS, Bárbara Simas; BALBINO, Valdir Queiroz; BATISTA, Marcus Vinícius de Aragão. Genetic Diversity of Human and Animal papillomaviruses. In: Julian A. Cervantes Amaya and Miguel M. Franco Jimenez. (Org.). *Genetic Diversity: New Research*. Nova Science Publishers, 1 ed. 2012, p.1.

1. INTRODUÇÃO

O câncer cervical constitui um grave problema de saúde pública em todo o mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer cervical é o terceiro tipo de neoplasia mais prevalente no mundo, com 527.000 novos casos e mais de 265.000 mortes apenas no ano de 2012. Além disso, o câncer cervical figura como a quarta maior causa de mortes em todo o mundo e como o segundo tipo mais comum de câncer em mulheres com idade entre 15-44 anos. Mundialmente, a incidência de casos de câncer cervical é de 14/100.000 habitantes. Contudo, esta taxa de incidência é maior em países em desenvolvimento, com cerca de 15.7 casos por cada 100.000 habitantes, e menor em países desenvolvidos, com uma taxa de 9.9 casos a cada 100.000 habitantes (WHO, 2014).

Particularmente no Brasil, a incidência de novos diagnósticos de câncer cervical foram de 18.503 novos casos e 8.414 óbitos no ano de 2012, sendo considerada a quarta maior causa de mortes no Brasil, suplantadas pelo câncer de mama, pulmão e coloretal (WHO, 2014). Além disso, o câncer cervical é o segundo tipo de câncer mais incidente nas Regiões Norte e Nordeste do Brasil, (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Estudos genético-epidemiológicos têm sugerido que a etiologia do câncer cervical é complexa, envolvendo diversos fatores genéticos e ambientais na manifestação desse fenótipo (DE FREITAS et al., 2012a). Evidências têm demonstrado que infecções persistentes com variantes de Papilomavírus humano (HPV) concomitantemente com o comprometimento do sistema imunológico do indivíduo atuam de forma preponderante no processo de transformação dos queratinócitos no colo do útero (DE FREITAS et al., 2012a; TERMINI; VILLA, 2008). Contudo, a infecção pelo HPV é uma condição necessária porém não suficiente para o desenvolvimento do câncer cervical (ZUR HAUSEN, 1996, 2002), sendo outros fatores igualmente

importantes no desenvolvimento da carcinogênese cervical tais como estilo de vida, coinfeções com outros agentes virais ou bacterianos, múltiplas infecções causadas por distintos HPVs e fatores genéticos do hospedeiro e do vírus (DE FREITAS et al., 2012).

Diversos estudos mostram uma associação entre variabilidade genética dos HR HPVs na persistência e na progressão das lesões cervicais para o câncer cervical (BERUMEN et al., 2001; BURK et al., 2003; BURRONI et al., 2013; CHANG et al., 2011; CHANSAENROJ et al., 2012; CORNET et al., 2013; GHEIT et al., 2011; HO et al., 2005; LONDESBOROUGH et al., 1996; QUINT et al., 2010; SCHIFFMAN et al., 2010; SICHERO et al., 2007; VILLA et al., 2000; XI et al., 2007, 2012; YAMADA et al., 1997; ZEHBE et al., 2011; ZUNA et al., 2011). Alterações nas sequências dos nucleotídeos no genoma viral dos HR HPVs podem alterar o potencial oncogênico, levando algumas variantes a tornarem-se mais oncogênicas que outras. Dessa maneira, o conhecimento da diversidade genética do genoma viral dos HPVs circulantes em uma dada região é importante, principalmente no que se refere à patogenicidade causada por algumas variantes de HPVs, ao desenvolvimento de métodos de diagnósticos bem como de construção de vacinas.

Assim, a presente investigação conduziu uma análise de variabilidade genética do gene L1 e da longa região de controle (LCR) dos principais tipos de HPVs circulantes do Nordeste Brasileiro. Além disso, análises *in silico* foram realizadas com o objetivo de avaliar a possível repercussão biológica destas alterações nucleotídeas. Por fim, uma análise de associação caso-controle foi efetuada com polimorfismos do gene L1 do HPV16 e a susceptibilidade para lesões cervicais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Papilomavírus (PVs)

2.1.1 Breve histórico

A relação entre doenças genitais e infecções causadas por Papilomavírus (PVs) foi primeiro observada no século XIX, pelo médico italiano Rigoni-Stern, que notou uma associação positiva entre a atividade sexual e as taxas de câncer cervical. O primeiro PVs descoberto foi o Cottontail rabbit Papilomavírus (CRPV), que infecta coelhos. O pesquisador Richard Shope e seus colaboradores observaram que suspensões de CRPVs podiam imunizar os coelhos contra a papilomatose. Em outro estudo, Peyton Rous e colaboradores demonstraram a transformação de lesões papilomatosas em carcinoma de células escamosas em coelhos. Assim, os resultados destes dois estudos foram os primeiros a mostrar o envolvimento dos PVs no desenvolvimento de câncer (FREITAS et al., 2012b).

Em meados dos anos 1950, o potencial carcinogênico do HPV foi sugerido em estudos com pacientes portadores de uma doença hereditária chamada Epidermioplasia verruciformes (EV). Cerca de trinta anos depois, diversos grupos de pesquisa publicaram artigos científicos mostrando o envolvimento do HPV em lesões cervicais, em verrugas e em papilomas da laringe. Contudo, o grupo de pesquisadores liderado pelo alemão Harold zur Hausen sugeriram o envolvimento do HPV no câncer cervical. Subsequentemente, estudos foram realizados, confirmando o envolvimento do HPV em diversos tipos de câncer, genital e não genital (ZANDBERG et al., 2013), culminando no desenvolvimento de testes de DNA viral em amostras biológicas e vacinas contra a infecção por alguns PVs (BERNARD, 2013).

2.1.2 Morfologia e organização genômica

Papilomavírus (PVs) é um grupo de vírus epiteliotrópico e mucosotrópico, espécie-específico, que infecta uma grande variedade de mamíferos, aves e répteis (BERNARD et al., 2010). Atualmente, existem cerca de 240 sequências de nucleotídeos de distintos PVs depositados no GeneBank (<http://pave.niaid.nih.gov/#home>). Por sua importância na saúde pública e na economia, alguns PVs têm sido mais amplamente estudados, como no caso do HPV e do Papilomavírus bovino (BPV), respectivamente.

De um modo geral, PVs é um grupo de vírus não envelopado, com um capsídeo icosaédrico, com cerca de 55nm de diâmetro. O genoma dos PVs é dupla fita circular, variando de 6953pb (Chelonia mydas Papilomavírus tipo 1, CMPV1) a 8607pb (Canine Papilomavírus tipo I, CPV1) de comprimento (VAN DOORSLAER, 2013). O genoma dos PVs codifica proteínas estruturais, envolvidas na formação do capsídeo (proteína L1 e a proteína L2) e diversas proteínas não estruturais, que podem ou não estar presentes (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 e E8) (BERNARD et al., 2010; VAN DOORSLAER, 2013).

2.1.3 Taxonomia

O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV) classifica os PVs como pertencentes à família *Papillomaviridae*. O ICTV utiliza análises filogenéticas do gene L1, que é altamente conservado neste grupo de vírus, para a classificação dos PVs em gênero, espécie e cepas (BERNARD et al., 2010; DE VILLIERS et al., 2004). De acordo com essa classificação, os PVs que possuem acima de 60% de homologia da sequência de nucleotídeos do gene L1 são agrupados em gênero. Por conseguinte, os PVs que

possuem um percentual de 71 a 89% de homologia de sequências do gene L1 são categorizados em espécies. Uma cepa de PVs difere em 10% na sequência de nucleotídeo do gene L1 (BERNARD et al., 2010; DE VILLIERS et al., 2004). A nomenclatura comumente usada classifica os PVs em gênero, espécie e tipo e variante. O termo *variante* é empregado quando há menos de 2% de identidade das sequências de nucleotídeo (<http://pave.niaid.nih.gov/#home>). Recentemente, o ICTV propôs uma nova classificação e nomenclatura para variantes de PVs. Segundo esta nova classificação, o sequenciamento de todo o genoma viral deve ser utilizado para fins de classificação, por ser mais robusto quando comparados com a sequência de nucleotídeos do gene L1 (BURK et al., 2013; CHEN et al., 2011; SMITH et al., 2011). Além disso, a sequência de PVs de todo o genoma viral deve diferir em 1% para a classificação de uma variante, as sublinhagens devem diferir em 0,5% a 1% e cada variante deve ser escrita com um termo alfa-númerico (BURK et al., 2013).

Atualmente, existem trinta e sete gêneros PVs descritos e vinte e sete sequências depositadas no *GeneBank*, que são PVs ainda não classificados (VAN DOORSLAER, 2013). É sabido que a diversidade de PVs é subestimada e um grande número destes vírus ainda será detectado nos próximos anos. Para evitar a confusão causada pela nomenclatura, o ICTV recomenda o uso de alfabeto grego para a escrita dos gêneros e, para novos gêneros, a adição do prefixo Dyo (BERNARD et al., 2010; DE VILLIERS et al., 2004). Assim, os PVs são classificados em: *Alphapapilomavírus*, *Betapapilomavírus*, *Gamapapilomavírus*, *Deltapapilomavírus*, *Epislonpapilomavírus*, *Zetapapilomavírus*, *Etapapilomavírus*, *Thetapapilomavírus*, *Lotapapilomavírus*, *Kappapapilomavírus*, *Lambdapapilomavírus*, *Mupapilomavírus*, *Nupapilomavírus*, *Xipapilomavírus*, *Pipapilomavírus*, *Rhopapilomavírus*, *Sigmapapilomavírus*, *Taupapilomavírus*, *Upsilonpapilomavírus*, *Phipapilomavírus*, *Chipapilomavírus*,

Psipapilomavírus, *Omegapapilomavírus,* *Dyodeltapapilomavírus,*
Dyoepsilonpapilomavirus, *Dyozetapapilomavírus,* *Dyoetapapilomavírus,*
Dyothetapapilomavírus, *Dyoiotapapilomavírus,* *Omikronpapilomavírus,*
Dyolambdapapilomavírus, *Dyomupapilomavírus,* *Dyonupapilomavírus,*
Dyomikronpapilomavírus, *Dyophipapilomavírus,* *Dyorhopapapilomavírus,*
Dyosigmapapilomavírus e *Dyochipapilomavírus* (<http://pave.niaid.nih.gov/#home>)

(Figura 1).

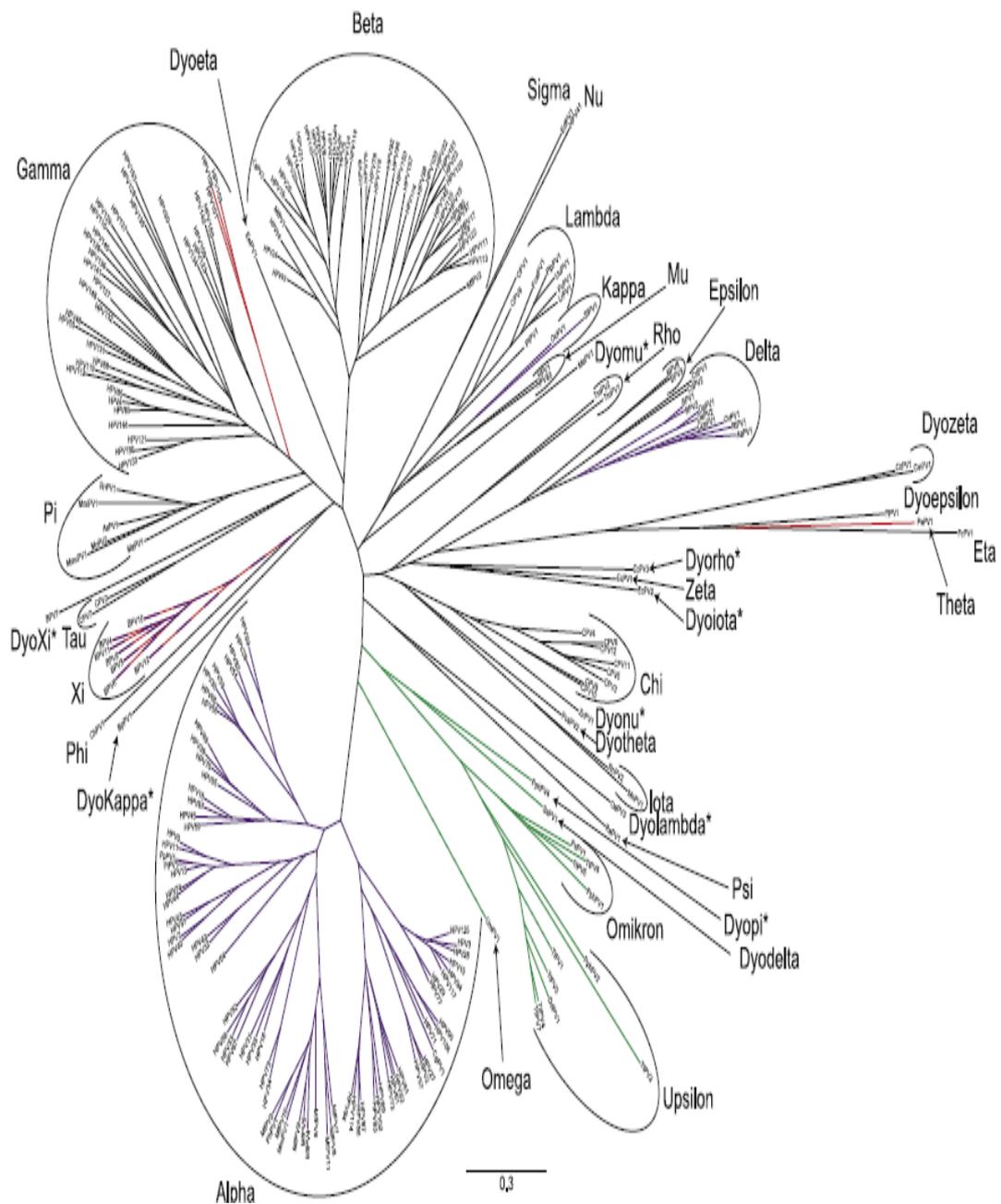


Figura 1. Árvore filogenética mostrando os trinta e sete gêneros de PVs, baseadas no sequenciamento e alinhamento dos genes E1, E2, L1 e L2 de 241 PVs. (*) Novos gêneros de PVs que estão sob consideração do ICTV (VAN DOORSLAER, 2013).

2.1.4 Gênero Alphapapilomavírus

O gênero Alphapapilomavírus (Alpha-PVs) comumente infecta humanos e macacos e são divididos em dois principais grupos: os vírus mucosotrópicos (que infectam células da camada basal da mucosa) e os vírus cutaneotrópicos (que infectam células da camada basal da pele) (CUBIE, 2013) (Figura 2). Alguns membros deste gênero são altamente carcinogênicos, podendo causar câncer (CUBIE, 2013; SCHIFFMAN et al., 2009). Seis membros desse gênero estão associados com lesões cutâneas benignas ou malignas, tais como HPV2, 3, 4, 5, 8 e o HPV10 (CUBIE, 2013). Por outro lado, diversos membros deste gênero atuam como carcinógenos na região genital e não genital e são divididos em três grupos: a) Alpha-PVs altamente carcinogênico em humanos, que incluem os genótipos HPV16, 18, 31, 33, 45, 51 e 52; b) Alpha-PVs provavelmente carcinogênico em humanos, que inclui o genótipo HPV68; c) Alpha-PVs possivelmente carcinogênico em humanos, em que fazem parte os HPV26, 53, 64, 65, 66, 67, 69, 70, 73, 82. Além disso, outros membros estão frequentemente associados a lesões benignas na região genital e não genital, tais como o HPV6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81 e 89 (CUBIE, 2013; SCHIFFMAN et al., 2009).

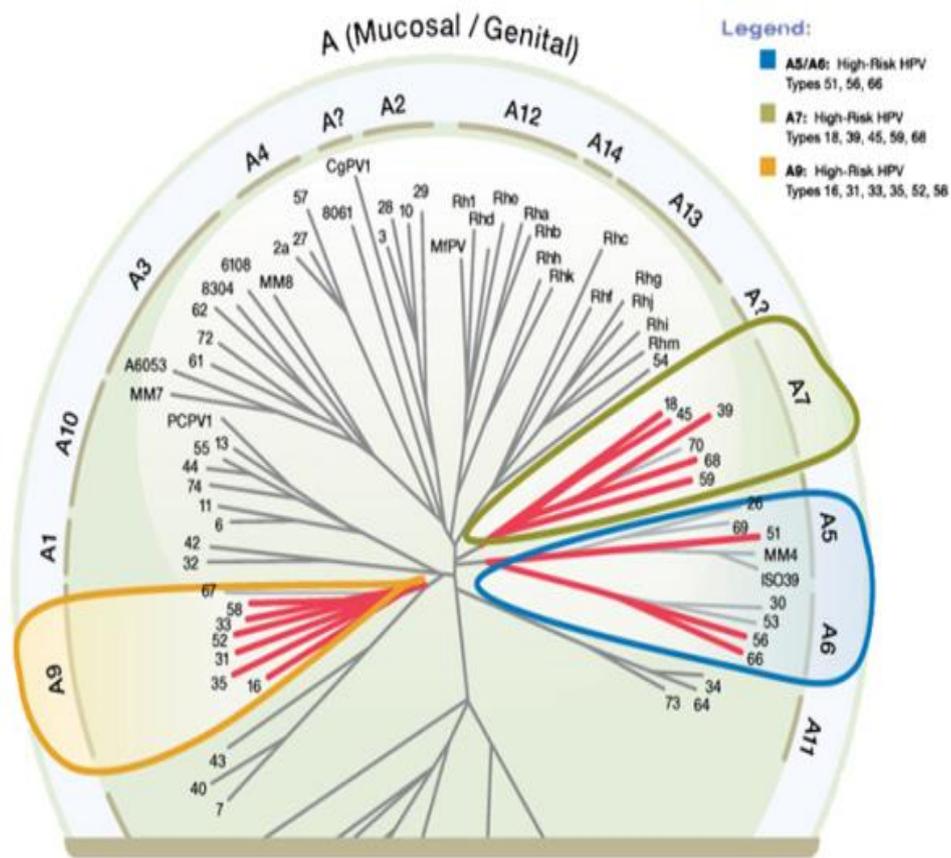


Figura 2. Árvore filogenética mostrando as espécies dos Alpha-PVs, baseadas no sequenciamento do gene L1. Em destaque, encontram-se os membros do Alpha-9, Alpha-7 e Alpha-5/6, mais comumente detectado em lesões cervicais e câncer cervical (MOLECULAR STUFF, 2014).

2.2 Papilomavírus humano (HPV)

2.2.1 Organização do genoma viral

O HPV é um vírus de DNA dupla fita circular, contendo aproximadamente 8.000 pares de bases (pb) associados às histonas, com capsídeo não envelopados (zur HAUSEN, 1996). O HPV possui oito quadros abertos de leitura (do Inglês, *Open Reading Frames- ORFs*) que se expressam na fase precoce (*early*) ou na fase tardia (*late*) do ciclo de infecção. Os genes que se expressam na fase precoce (designados E), codificam proteínas não estruturais e são subdivididos em E1, E2, E4, E5, E6 e E7.

Estas proteínas E são responsáveis pela replicação viral, transformação celular e controle transcricional. Os genes expressos na fase tardia (designados L) são genes estruturais, denominados L1 e L2. Estas proteínas estruturais do HPV tem como função codificar as proteínas do capsídeo viral. Além destes dois grupos de genes, o DNA do HPV contém duas regiões não traduzidas (*Non coding region*, NCR1) e *Long control Region*, NCR2 ou LCR) que regulam a transcrição e replicação viral. A NCR está localizada entre os genes E5 e L2 e contém o sítio de poliadenilação (pAE), que regula a expressão dos genes precoce do genoma viral. A LCR está situada entre os gene L1 e o oncogene E6 e contém diversos sítios de ligação para fatores transcricionais celular e viral, regiões promotoras e uma região de replicação do DNA viral (BURK et al., 2013; CHEN et al., 2011; SCHWARTZ, 2013; SMITH et al., 2011; ZUR HAUSEN, 1996, 2002) (Figura 3).

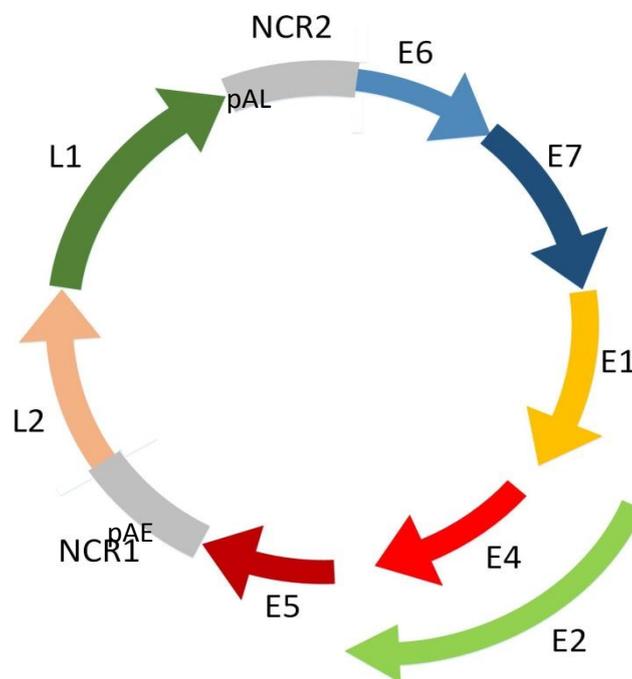


Figura 3. Representação esquemática do genoma viral do HPV16. A figura mostra os genes designados E (*Early* - genes de expressão precoce durante o ciclo de infecção viral), os genes L (*Late* - genes de expressão tardia durante o ciclo de infecção viral) e as regiões não codificantes NCR1 e LCR (regiões de controle de expressão). pAE: Sítio de poliadenilação dos transcritos precoces do ciclo de infecção. pAL: Sítio de poliadenilação dos transcritos tardios do ciclo de infecção.

2.2.2 Entrada do HPV na célula

O mecanismo pelo qual o HPV entra na célula e os receptores envolvidos neste processo ainda não estão completamente elucidados. A hipótese sugerida atualmente é que a proteína L1 do HPV interage com os receptores heparan sulfato (HSPGs) e outros componentes de membrana das células basais das mucosas anogenitais, tais como a laminina (DOORBAR et al., 2012; JOHNSON et al., 2009; SAPP e DAY, 2009). Estas moléculas são amplamente encontradas na superfície celular dos queratinócitos, atuando como receptores primários destes vírus. Após a ligação do vírus à estas moléculas da superfície dos queratinócitos, ocorrem alterações conformacionais que resultam na exposição da região amino terminal da proteína L2. A exposição dessa região permite a ação da furina convertase que cliva uma região de L2, resultando em uma segunda alteração conformacional, que expõe o sítio de ligação para um segundo co-receptor. Acredita-se que este segundo co-receptor seja a $\alpha 6$ integrina. A entrada do genoma viral nos queratinócitos ocorre por endocitose. Após a entrada do vírus na célula hospedeira, ocorre a acidificação das vesículas de endocitose, levando à desencapsidação do genoma viral. Subsequentemente, o genoma dos HPVs migram para o núcleo da célula, assumindo a forma episomal. Assim, inicia-se o ciclo de replicação viral, com a expressão dos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7 (COMBITA et al., 2001; DOORBAR et al., 2012; GIROGLOU et al., 2001; JOHNSON et al., 2009; SAPP e DAY, 2009; WOODMAN et al., 2007) (Figura 4).

2.2.3 Replicação viral

O ciclo viral dos HPVs está bem adaptado para o ciclo de vida das células epiteliais do hospedeiro, ou seja, a expressão gênica e o ciclo de infecção dos HPVs acompanham o ciclo de diferenciação dos queratinócitos desde o a camada basal até o

estrato córneo. Após a entrada do HPV na célula hospedeira, as proteínas E1 e E2 medeiam a replicação do genoma viral em baixos níveis. Durante o processo de divisão celular das células da camada basal, algumas células filha movem-se para o estrato superior das camadas da mucosa, iniciando o processo de diferenciação celular. Neste estágio, o genoma viral inicia a transcrição dos genes da fase tardia do ciclo de infecção, sendo a proteína E2 do HPV chave nesse processo. A proteína E2 regula dois promotores no genoma viral, o p97 (localizado na região 3' da LCR) e o promotor dependente de diferenciação p670 (localizado no gene E7). O aumento dos níveis de E2 ocorre através da ativação do promotor p670. Por conseguinte, altos níveis de E2 inibem apenas o promotor p97, responsável pela expressão dos genes da fase inicial, permitindo a expressão dos genes da fase tardia do ciclo de replicação viral, que incluem a expressão dos genes E4 (que facilita a liberação dos vírions) e dos genes L1 e L2 (codificam os genes para o capsídeo viral). Alternativamente, o sinal de poliadenilação precoce (pAE) bloqueia a expressão dos genes da fase tardia durante o início do processo de infecção, inibindo a expressão prematura de moléculas imunogênicas e assegurando a persistência da infecção viral. Finalmente, as partículas virais são liberadas com ajuda da proteína E4, que desmancha a rede de citoqueratina e permite a liberação dos vírus (BERNARD, 2013; DOORBAR, 2013; MCBRIDE, 2013).

2.2.4 O papel do gene E1

De um modo geral, durante o início do ciclo de infecção por HPV, a proteína E1 é expressa em baixos níveis e tem fraca afinidade pela sequência consenso AACNAT na região “ori”(origem de replicação), localizada no segmento 3' da LCR. Assim, para aumentar a afinidade de ligação, a proteína E1 forma um complexo com a proteína E2, resultando em um heterodímero E1-E2-ori. Este complexo facilita o recrutamento de

outras moléculas de E1, se ligando mais eficientemente à sequência palíndrome AACCG(N4)cGGTT na LCR, permitindo, assim, a atividade catalítica de síntese de DNA. Dessa forma, a proteína E1 atua como uma helicase, desenrolando o genoma viral para a síntese de uma molécula de DNA (BERGVALL et al., 2013) (Figura 5).

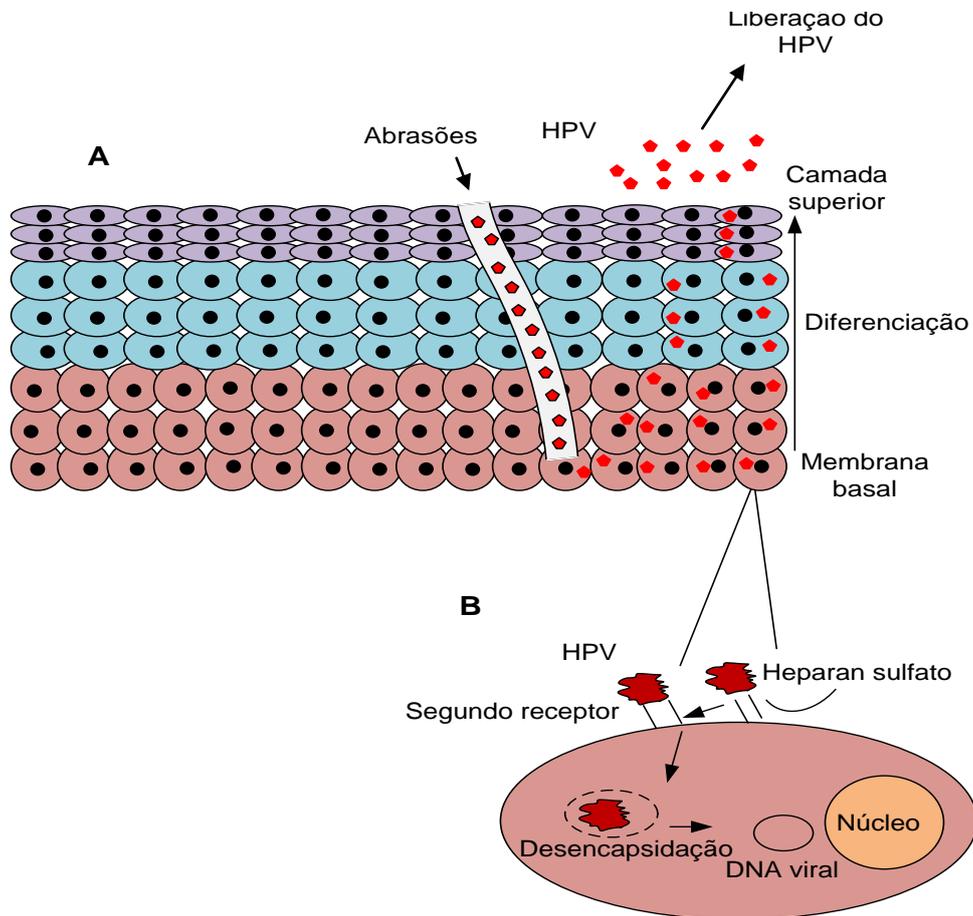


Figura 4. Ciclo da infecção viral do HPV. A- Microabrasões do epitélio mucoso permitem a entrada e o alcance do HPV até as células de reserva da camada basal. Após a entrada na célula, inicia-se a expressão dos genes precoces E1, E2, E5, E6 e E7, que estão envolvidos com a replicação viral, transformação celular e controle transcricional do genoma viral. À medida que as células da camada basal se dividem e se acumulam nos estratos superiores, ocorre também a diferenciação dos queratinócitos e, concomitantemente, inicia-se a expressão dos genes envolvidos com a síntese do capsídeo viral (gene L1 e L2) e liberação das partículas virais (gene E4). Por fim, os vírus são liberados da camada do estrato córneo, tornando-se aptos para infectarem uma nova célula. B- A entrada do HPV nas células da camada basal ocorre através das HSPGs e/ou receptores de laminina. Subsequentemente, várias alterações na conformação da proteína L2 permitem o reconhecimento do segundo receptor, a internalização da partícula viral e a sua desencapsidação. Por fim, o genoma viral se dirige ao núcleo da célula hospedeira, permanecendo nesta região em formato episossomal ou se integrando ao genoma do hospedeiro.

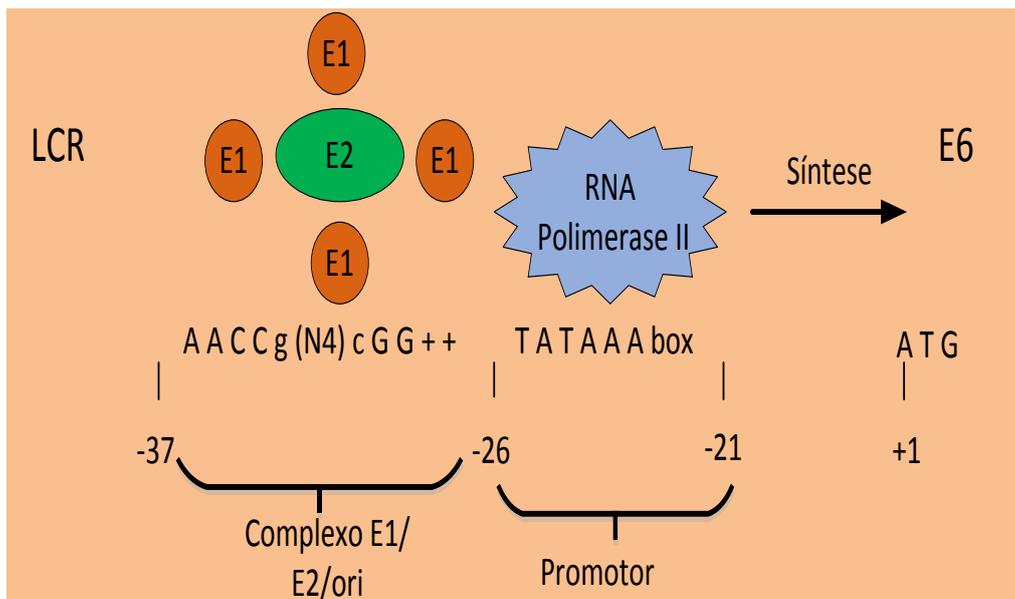


Figura 5. Replicação do DNA viral. A região da LCR contém sítios de ligação para o complexo E1-E2-ori. Este heterodímero recruta outras moléculas de E1, permitindo a atividade de helicase desta proteína e síntese do DNA viral.

2.2.5 O papel do gene E2

Além da sua função na replicação viral, mencionada anteriormente, o gene E2 tem um papel importante na ativação ou repressão da transcrição dos genes E, do genoma viral. Por exemplo, a ligação da proteína E2 (ou de suas isoformas) em determinados sítios da LCR compete com a ligação dos fatores transcripcionais celulares, reprimindo ou ativando a expressão dos genes precoce do genoma viral. Além da regulação do genoma viral, estudos mostram que a proteína E2 também regula a expressão de genes humanos, nomeadamente os genes que codificam para as metaloproteinases (MMP9), interleucinas (IL-10), beta-4 integrinas e telomerase reversa humana (hTERT). Devido às mutações ou integração do genoma viral no genoma do hospedeiro, podem ocorrer a diminuição ou parada da expressão do gene E2 e, como consequência, a diminuição da sua atividade repressora, culminando no aumento da expressão dos oncogenes E6 e E7. Além das funções de replicação de regulação da

expressão gênica, a proteína E2 também atua na segregação, empacotamento e manutenção do genoma viral; na interação com outras proteínas virais, tais como E1, E1^{E4} e E7; e atua também como um carcinógeno (MCBRIDE, 2013).

2.2.6 O papel do gene E4

As funções da proteína E4 no ciclo da infecção viral pelo HPV ainda não está totalmente esclarecida. Embora o gene E4 se localize na região de expressão precoce do genoma viral, sua expressão é tardia, uma vez que essa proteína é encontrada exclusivamente em camadas mais diferenciadas do epitélio mucoso. Seu mRNA sofre *splicing* com cinco aminoácidos do gene E1, gerando uma proteína E1^{E4}. A proteína E1^{E4} altera a conformação dos filamentos de citoqueratina dos queratinócitos, facilitando a liberação das partículas virais. Além disso, a proteína E4 tem se mostrado um interessante biomarcador específico para a detecção de HPV, tendo em vista a alta expressão do gene E4 em queratinócitos infectados (DOORBAR, 2013).

2.2.7 O papel dos oncogenes E5, E6 e E7 na transformação celular

Os oncogenes E5, E6 e E7 dos HPVs codificam as oncoproteínas E5, E6 e E7, respectivamente. As oncoproteínas dos HPVs possuem as funções de estimular a proliferação celular, estimular a sobrevivência celular e modular a diferenciação dos queratinócitos. O gene E5 codifica a proteína E5, uma oncoproteína que não é encontrada em todos os HPVs. Os HR HPV codificam a proteína E5 com uma sequência conservada de aminoácidos designada E5 α , que possui uma fraca atividade transformante. Os genótipos encontrados nos LR HPV codificam para duas proteínas, designadas E5A ou E5B, que também possuem fraca atividade transformante. Os

primeiros estudos referentes à oncoproteína E5 foram realizados com o HPV6E5, que demonstraram uma moderada atividade transformante. Contudo, todos os demais estudos abrangem o HPV16. Estes estudos tem mostrado que a proteína E5 do HPV16 (16E5) aumenta a expressão dos receptores para o fator de crescimento epitelial (EGFR), levando ao aumento da proliferação celular; protege contra a indução de apoptose através da *downregulation* dos receptores Fas; promove também um *downregulation* da expressão de proteínas da superfície celular MHC, uma vez que E516 interage com a cadeia pesada das moléculas de MHC Classe-I, aprisionando-as no retículo endoplasmático rugoso e, assim, impedindo o seu transporte até a superfície celular; E516 também interfere na maturação da moléculas de MHC classe-II no interior das vesículas endossômicas, impedindo também o transporte destas moléculas até a superfície celular (Figura 6) (DIMAIO; PETTI, 2013).

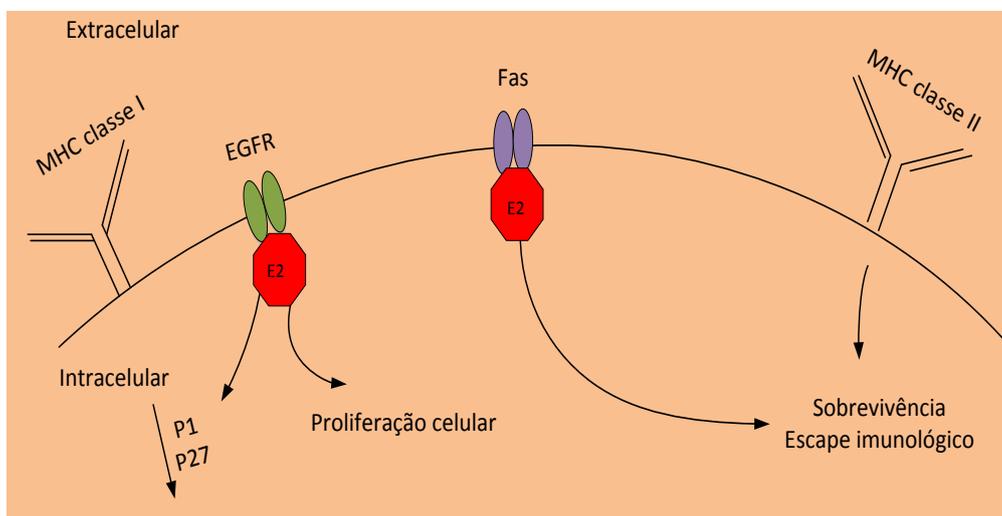


Figura 6. Alvos celulares da proteína E5 durante a fase inicial da carcinogênese. A proteína E5 se liga às cadeias pesadas das moléculas de MHC classe I e II, impedindo o seu deslocamento até a membrana celular. Os receptores Fas e EGFR também são alvos da proteína E1, mediando a proliferação celular e o escape imunológico.

A oncoproteína E6 é codificada pelo gene E6 dos HPVs. Esta oncoproteína desempenha um papel muito importante na transformação dos queratinócitos através de sua interação com diversos alvos celulares, tais como a proteína p53, proteínas da família PDZ, a telomerase, a proteína Bak, TNF e Fas. A proteína p53 é um supressor tumoral que regula o ciclo celular e a sobrevivência da célula. De um modo geral, a proteína E6 liga-se a uma ubiquitina-ligase chamada E3, formando um complexo heterodímero chamado E6-E6AP. Este heterodímero E6AP degrada a proteína p53 via ubiquitina-proteassomo. A oncoproteína E6 também medeia o processo de transformação independente da via da p53. Por exemplo, E6 dos HR HPV ligam-se às proteínas da família PDZ (que atuam na supressão tumoral), degradando-as. Um outro alvo da proteína E6 é a degradação da proteína Bak, que impede a liberação de elementos pró-apoptóticos da mitocôndria para o citoplasma da célula, inibindo a apoptose. E6 também pode se ligar ao receptor para o fator de necrose tumoral 1 (TNFR1) e aos receptores celulares da família Fas, impedindo a sua interação com o domínio da morte TRADD e FADD, respectivamente (Figura 7) (VANDE POL; KLINGELHUTZ, 2013).

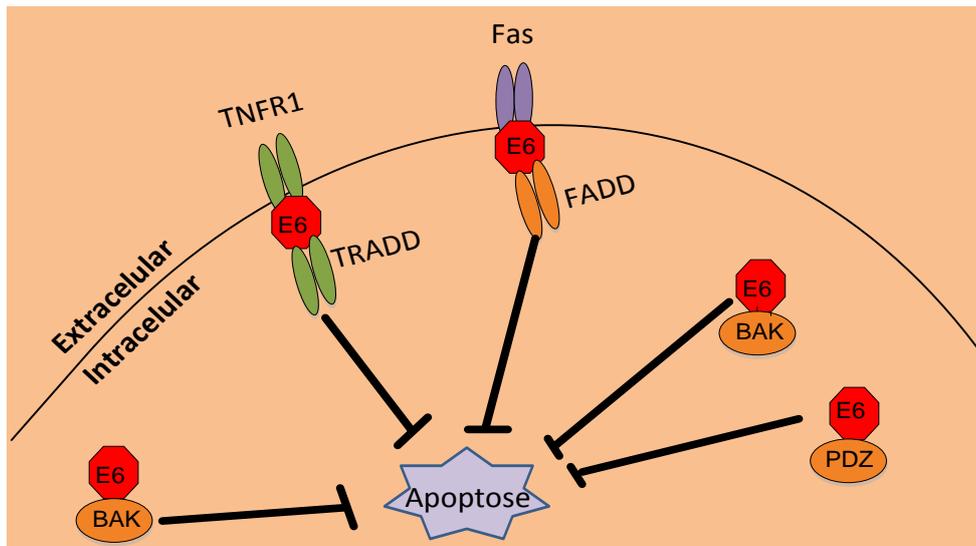


Figura 7. Alvos moleculares da proteína E6 durante o processo de carcinogênese. A proteína E6 impede o processo de apoptose através de sua ligação com as proteínas p53, TNFR1, Fas, Bak e PDZ.

De modo semelhante à oncoproteína E6, a proteína E7 atua na transformação dos queratinócitos. De modo geral, a oncoproteína E7 liga-se às proteínas da família pRb (retinoblastoma), degradando-as. A proteína pRb é necessária para a manutenção do ciclo celular uma vez que, quando fosforilada pelas proteínas ciclina quinase dependente (CDK), se ligam ao fator transcricional celular E2F, inibindo a progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular. A degradação da proteína pRb promove a proliferação celular. E7 também se liga as proteínas p21 reprimindo a ação desta proteína cuja função é inibir o ciclo celular em resposta a algum dano celular (Figura 8) (ROMAN; MUNGER, 2013).

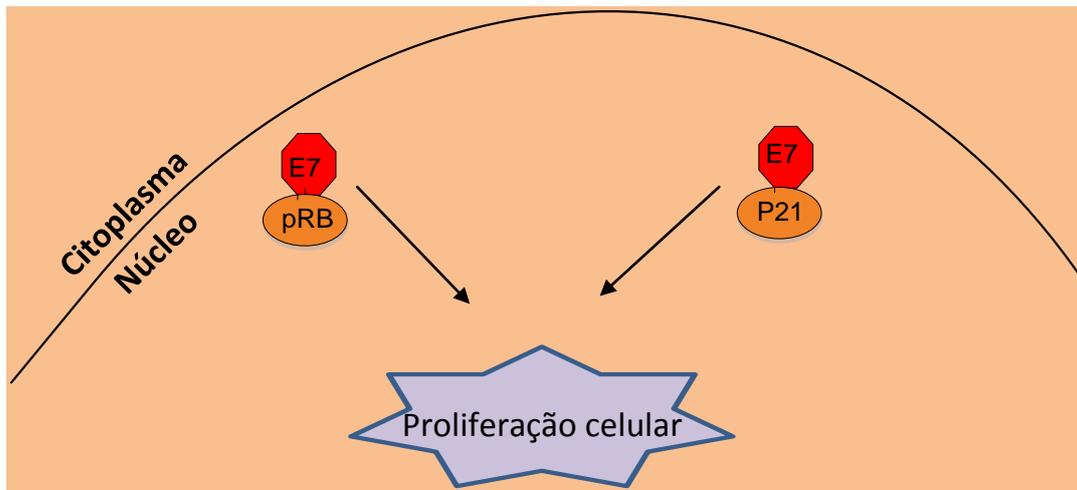


Figura 8. Alvos moleculares da proteína E7 durante o processo de carcinogênese. A proteína E7 se liga às proteínas celulares pRB e p21, degradando-as.

2.2.8 Os genes L1 e L2

Os genes L1, L2 e E4 são expressos nas camadas superiores do estrato mucoso e estão associados com a produção do capsídeo viral, empacotamento do genoma viral e liberação da partícula viral madura, capaz de infectar uma nova célula. O capsídeo viral é formado por um arranjo estrutural de 360 cópias da proteína L1, organizadas em 72 capsômeros, sendo cada capsômero composto de cinco moléculas de L1 (CHEN et al., 2000). Mais de 85% do capsídeo viral é composto da proteína L1, sendo o restante composto da proteína L2 (cerca de 12 cópias) (BISHOP; DASGUPTA; CHEN, 2007). A proteína L1 caracteriza-se por possuir uma habilidade de se automontar em partículas semelhantes a vírus (do Inglês, *virus-like particles*- VLPs), sem a ajuda de chaperones moleculares. As VLPs são potentes imunógenos e, por causa dessa propriedade, três vacinas contra nove genótipos de HPVs foram desenvolvidas, nomeadamente a vacina bivalente (HPV16/18), a vacina quadrivalente (HPV6, 11, 16 e 18) e a vacina nonavalente (HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58) (BUCKET al., 2013). Estudos de

cristalografia têm mostrado que a proteína L1 dos HPVs possuem cinco regiões imunodominantes, nomeadamente as regiões da alça externa FG, HI, BC, DE e EF da proteína L1 dos HPVs (CHEN et al., 2000). A imunização contra o HPV utilizando VLPs elicit anticorpos contra estas regiões imunodominantes da proteína L1. De modo diferente, a proteína L2 não possui a propriedade de se automontar em VLPs, entretanto participa do processo de encapsidação do genoma viral, da entrada do HPV na célula e do deslocamento do seu genoma para o núcleo da célula hospedeira (BUCK et al., 2013; WANG; RODEN, 2013).

A expressão dos genes L1 e L2 do ciclo viral no estágio tardio ocorre provavelmente para evitar uma precoce exposição das partículas imunogênicas ao sistema imune. A transcrição do gene L1 termina 100pb *downstream* a LCR, com a regulação do terminal pAL. O mRNA da proteína L1 é gerado através de *splicing*, onde ocorre a remoção dos genes da fase precoce. Após a síntese no citoplasma, as proteínas L1 e L2 direcionam-se para o núcleo, iniciando o processo de automontagem (BUCK et al., 2013; WANG; RODEN, 2013).

2.2.9 NCR e a LCR

As regiões não codificantes NCR e a LCR representam mais de 10% do genoma viral. A NCR localiza-se entre o gene E5 e L2 e a LCR localiza-se entre o gene L1 e o gene E6 (CHEN et al., 2011; SMITH et al., 2011). A NCR1 é a região mais polimórfica do genoma viral (SMITH et al., 2011) e onde se encontra um importante sítio de poliadenilação, chamado pAE, que controla a expressão dos genes da fase precoce do ciclo viral (BERNARD, 2013).

A LCR contém os promotores p97 (HPV16 e HPV31), p105 (HPV18) e o p99 (HPV31), além da origem de replicação (ori). A LCR também possui numerosos sítios de ligação para fatores transcricional celular e viral. Didaticamente, a LCR é dividida em três segmentos: A região 5', o segmento central e a região 3'. Além disso, a LCR possui quatro sítios de ligação ACCGNNNNCGGT para o fator transcricional viral E2 (BERNARD, 2013; O'CONNOR; BERNARD, 1995).

A região 5' da LCR contém um sítio de terminação AATAAA da síntese dos genes L1 e L2, localizados 100pb *downstream* o término do gene L1. Nesta região, existem sítios de ligação para alguns fatores transcricionais, tais como E2, proteína ativadora 1 (AP1) e Fator yin-yang (YY1) (BERNARD, 2013).

A região 3' da LCR contém os promotores para a transcrição dos genes da fase precoce (E6 e E7) e a região TATAAA box, localizados de 21 a 26pb *upstream* E6, onde se liga a RNA Polimerase II. A região 3' também possui uma segunda região TATA box, que está localizada de 32 a 37pb *upstream* E6 e é o sítio de ligação dos fatores transcricional E2, que reprime a transcrição, e do fator transcricional Promotor Seletivo 1 (Selective promoter 1, SP1), que ativa a transcrição. Assim, SP1 e E2 competem pelo sítio de ligação, regulando a síntese do DNA viral. Outro fator transcricional celular denominado YY1 também atua na região 3' da LCR, se ligando próximo ao promotor p97 e, assim, diminuindo a expressão dos oncogenes E6 e E7.

A região central da LCR contém os *enhancers* epitélio-específicos, sendo por este motivo que este grupo de vírus dificilmente infecta outros tipos celulares. Esta região contém diversos sítios de ligação para vários fatores transcricionais celulares que modulam a expressão dos genes virais, tais como: AP-1, Fator nuclear 1 (Nuclear Factor 1, NF-1), Fator de ligação à octâmeros 1 (Octamer Binding Factor 1, Oct-1), o YY1 e o C/EBP beta (BERNARD, 2013) (Figura 9).

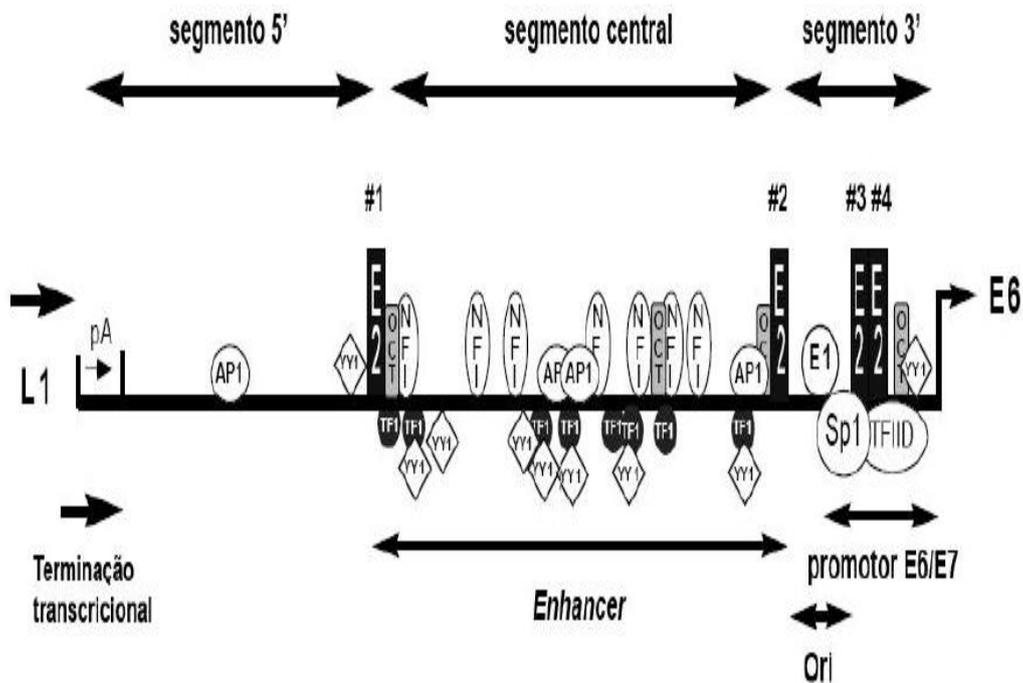


Figura 9. Representação esquemática da LCR do HPV16. A figura mostra os segmentos 5', região central e o segmento 3' da LCR. O segmento 5' contém o sítio de poliadenilação pAL, que regula o término de transcrição dos genes virais L1 e L2. A região central contém os sítios para diversos fatores transcricionais. O segmento 3' contém três regiões ligantes do fator transcricional E2 e uma região de ligação para o SP1, YY1 e a Oct-1 (Adaptado de O'CONNOR, 1995).

2.2.10 Integração do genoma viral ao genoma do hospedeiro

Como mencionado anteriormente, após a entrada do HPV no queratinócito, ocorre a desencapsidação do genoma viral, que se dirige ao núcleo da célula, mantendo-se na forma epissomal. Alternativamente, nos casos de lesões cervicais de alto grau de malignidade ou nos casos de cancer cervical, o genoma do HPV não se encontra na forma epissomal, e sim integrado ao genoma humano. A região de integração do genoma viral compreende a LCR (onde estão localizados os promotores p97 e p105) e os oncogenes E6 e E7. Além disso, durante o período de integração, ocorre a quebra da região E1/E2 no DNA viral, interrompendo a replicação viral e, concomitantemente,

contribuindo para a oncogênese uma vez que a proteína E2 atua como repressor de transcrição para os genes E6 e E7. Por sua vez, as oncoproteínas E6 e E7 participam da degradação da p53 e pRb, respectivamente, provocando instabilidade genômica e repressão das vias de apoptose (ZUR HAUSEN, 1996, 2002).

2.3 A infecção por HPV como um importante cofator para o câncer genital e não genital

Dados epidemiológicos mostram que as infecções persistentes causadas pelos HPVs estão envolvidas em diversos cânceres genitais e não genitais. Um percentual de mais de 88% dos cânceres cervical e anal são atribuídos as infecção por HPV, sendo a grande maioria causados pelos HPVs 16 e 18. Além disso, mais de 43% dos casos de câncer de pênis e de vulva são atribuídos ao HPV, sendo também os genótipos 16 e 18 os mais prevalentes. Ademais, 70% dos casos de câncer de vagina e 26% dos casos de câncer na região orofaríngea são atribuídos ao HPV, sendo os genótipos 16 e 18 os mais prevalentes (BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015) (Figura 10).

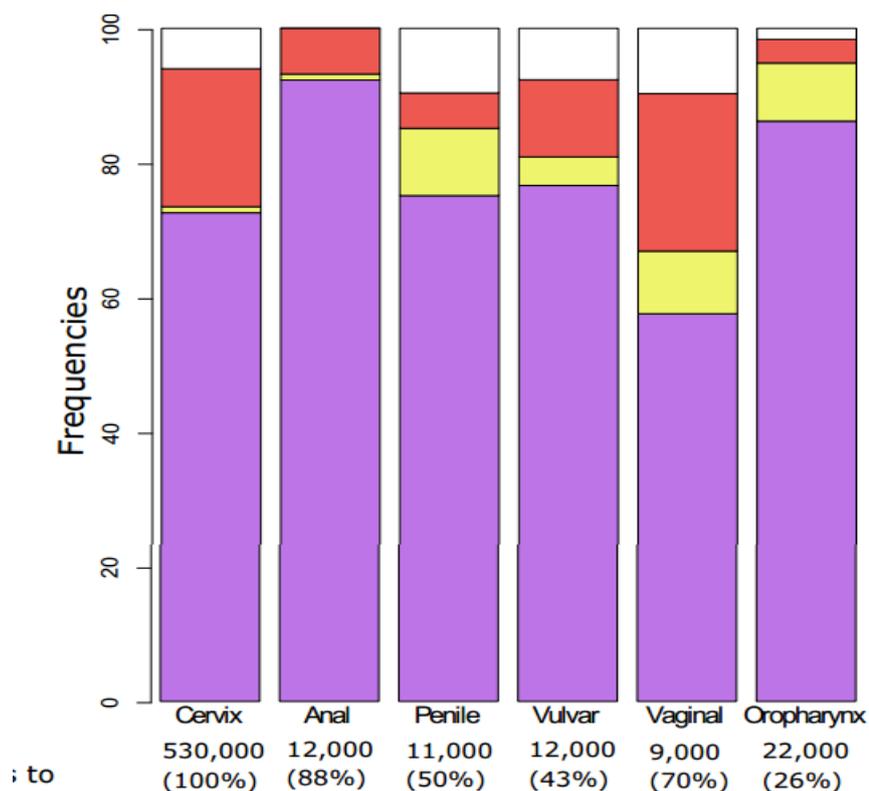


Figura 10. Número de novos casos de câncer em diversos sítios genitais e não genitais atribuídos ao HPV. A figura mostra o envolvimento do HPV nos cânceres de cérvix, ânus, pênis, vagina, vulva e orofaringe. Observa-se um maior envolvimento do HPV nos casos de cânceres anal, cervical. Por outro lado, há uma menor contribuição do HPV nos casos de câncer vagina e orofaringe. Barras lilás: Cânceres causados pelos HPV cobertos pela vacina bivalente. Barras Amarela: Cânceres causados pelos HPV cobertos pela vacina quadrivalente. Barra vermelha: Cânceres causados pelos HPV cobertos pela vacina nonavalente. Câncer causados por HPV não cobertos pela vacina (Adaptado de BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015).

2.3.1 O câncer cervical

O câncer cervical constitui um grave problema de saúde pública em todo o mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer cervical é o terceiro tipo de neoplasia mais prevalente no mundo, com 527.000 casos e mais 265.000 mortes por ano. O câncer cervical é a quarta maior causa de mortes em todo o mundo e o segundo tipo mais comum de cânceres em mulheres com idade entre 15-44 anos (WHO, 2014). Mundialmente, a incidência de casos de câncer cervical é de 14/100.00

habitantes. Esta taxa é maior em países em desenvolvimento, 15.7/100.000 e menor em países desenvolvidos, 9.9/100.000 habitantes (Figura 11).

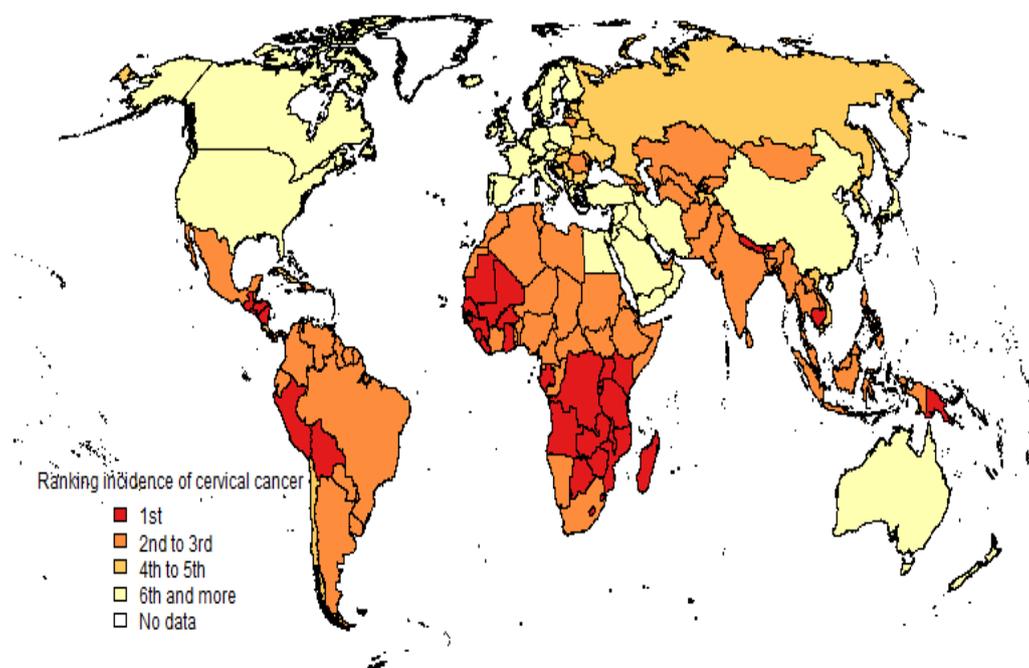


Figura 11. Incidência dos casos de câncer cervical em todo o mundo. A figura mostra que, no Brasil, o câncer cervical é o segundo tipo mais incidente em mulheres. Em outros países da América do Sul, América Central e em alguns países Africanos o câncer é o tipo mais incidente em mulheres (WHO, 2014).

Particularmente no Brasil, a incidência de novos diagnóstico de câncer cervical foi de 18,503 novos casos e 8,414 óbitos para o ano 2012, sendo a quarta maior causa de mortes no Brazil, ficando atrás do câncer de mama, pulmão e coloretal. Contudo, em mulheres de 15 a 44 anos, o cancer cervical é o segundo tipo mais incidente. Além disso, o câncer cervical é o segundo tipo de câncer mais incidente nas Regiões Norte e Nordeste do Brasil, ficando atrás apenas do câncer de pele não melanoma (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

A progressão das lesões cervicais e câncer cervical está associada com a infecção persistente por certos tipos de HPVs (SICHERO et al., 2007; VILLA et al., 2000; WOODMAN et al., 2007). A infecção pelo HR HPV comumente ocorre através de relação sexual e pode regredir entre 6-12 meses (LI et al., 2011). Estas lesões cervicais são bem caracterizadas e detectadas em exames clínicos, citológicos e histopatológicos. No entanto, se as mulheres não forem tratadas, essas condições pré-malignas podem progredir para: a) neoplasia intraepitelial cervical grau 1 (NIC1) (ou displasia leve); b) neoplasia intraepitelial cervical grau - Grau 2 (NIC 2) (ou displasia moderada); c) neoplasia intraepitelial cervical grau - Grau 3 (NIC3) ou carcinoma *in situ*, que é caracterizada por uma displasia grave e; d) carcinoma de células escamosas ou adenocarcinoma (LI et al., 2011). No Sistema de Bethesda, outros termos são empregados, tais como: células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS); e lesões intra-epiteliais (SIL), compreendendo lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL) e lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL) (BROSO; BUFFETTI, 1993).

2.3.2 Principais tipos de HPVs envolvidos na carcinogênese cervical

Dados epidemiológicos mostram que os HPVs 16, 18, 31 e 52 são os quatro tipos mais frequentes em mulheres sem lesões cervicais. Contudo, a frequência de certos tipos de HPVs podem mudar de acordo com o grau de lesão cervical, os tipos casos de câncer cervical, e a região geográfica onde as pacientes residem. Por exemplo, em pacientes com LSIL, os quatro tipos de HPVs mais frequentes são os genótipos 16, 51, 31 e 52, enquanto nas pacientes que apresentam HSIL os quatro genótipos mais frequentes são os HPVs 16, 31, 58 e 33. Nos casos de câncer cervical, os quatro genótipos mais encontrados são os HPVs 16, 18, 58 e 33. Além disso, os tipos de HPV associados ao câncer de colo do útero em países em desenvolvimento são diferentes

daqueles em países desenvolvidos. Nos países em desenvolvimento, há uma maior prevalência dos HPV16, 18, 58 e 33, enquanto nos países desenvolvidos os genótipos mais prevalentes são os HPV16, 18, 33 e 31. No carcinoma de células escamosas, os HPV mais encontrados são os genótipos 16, 18, 58 e 33. No adenocarcinoma, HPV mais frequentes são 18, 16, 45 e 33 (DE SANJOSE et al., 2010).

Os membros dos gêneros Alpha-9 e Alpha-7 são os tipos de HPV que estão mais associados com lesões cervicais e outros cânceres relacionados com o HPV (DE SANJOSE et al., 2010). Além disso, HPV6 e HPV11, que causam verrugas, são membros do Alpha-10 e estão associados com câncer de pulmão (AGUAYO et al., 2007; ALBANELL et al., 1997; CARPAGNANO et al., 2011). Por outro lado, o HPV que pertence ao gênero beta-PVs é geralmente associado com infecções de pele. Outros tipos de HPV pertencentes a três gêneros, Gamma, Mu e Nu, podem causar papilomas e verrugas cutâneas, que não costumam evoluir para o câncer (FREITAS et al., 2012b).

2.3.3 Vacinas profiláticas contra os HPV

Atualmente, existem duas vacinas disponíveis no mercado que tem como alvo erradicar as infecções causadas pelos HPV16/18/6/11. A vacina bivalente contém VLPs dos HPV 16/18 (Cervarix, GlaxoSmithKline Biologicals), enquanto a vacina quadrivalente contém VLPs para os HPV 6/11/16/18 (Gardasil, Merck). Além disso, recentes estudos tem demonstrado que além dos HPV mencionados, a vacina bivalente mostra uma proteção cruzada para os tipos de HPV31, 33 and 45 (CÓMBITA et al., 2013; GOLDSTONE et al., 2013; HILDESHEIM et al., 2014; KAHN et al., 2012; KAVANAGH et al., 2014; LEHTINEN et al., 2012; MALAGÓN et al., 2012; TABRIZI et al., 2014; WHEELER et al., 2012). Entretanto, as atuais vacinas disponíveis no mercado não cobrem outros tipos oncogênicos, como os HPV 31, 33,

45, 51, 52, 56, 58 e 66. Para tal, foi recentemente aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) a vacina nonavalente HPV V503 (Merck Sharp and Dohme), que pretende proteger 97% dos casos de câncer de cérvix, vagina e vulva. Esta vacina contém VLPs dos HPV 6/11/16/18/ 31/33/45/52/58 (MERCK, 2014).

2.3.4 Cofatores para o cancer cervical

Embora um grande número de mulheres sexualmente ativas sejam infectadas por distintos tipos de HPV, uma minoria desta população desenvolve lesão cervical ou câncer cervical (WOODMAN et al., 2007). Assim, existem outros fatores genéticos e ambientais que colaboram para a imortalização dos queratinócitos (DE FREITAS et al., 2012).

Dentre os fatores ambientais, estudos tem sugerido uma associação entre contraceptivos orais, tabagismo, números de partos e co-infecções com múltiplos agentes e o risco de desenvolver lesões cervicais (AU, 2004; DE FREITAS et al., 2012). Os contraceptivos orais agem como co-fatores de risco uma vez que a LCR dos HPV contém sítios de ligação para hormônios, aumentando a expressão dos oncogenes virais (AMARAL et al., 2014; EFIRD et al., 2011; GHANEM et al., 2011; INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER et al., 2007). Acredita-se que o tabagismo atua como cofator ambiental no desenvolvimento de lesões e cancer cervical devido à redução da resposta imune e danos genéticos causados pelo tabaco (MACLAUGHLAN; LACHANCE; GJELSVIK, 2011; MA et al., 2011; MOKTAR et al., 2011; TRIMBLE et al., 2005; WARD; BERENSON; BREITKOPF, 2011). Co-infecções com múltiplos agentes, como HIV e Clamídia (SAFAEIAN et al., 2010), tem sido considerado também importantes cofatores (DE FREITAS et al., 2012).

Além dos fatores ambientais, existem também os fatores genéticos do hospedeiro e do vírus. Por exemplo, diversos estudos tem mostrado um risco maior entre polimorfismos de genes envolvidos na via da apoptose (TP53 e MDM2) e genes envolvidos na resposta imunológica (IL-10, TNF, HLA) e a susceptibilidade para o desenvolvimento de lesões cervicais e câncer cervical (AMARAL et al., 2014; BHATTACHARYA; SENGUPTA, 2005; HARIMA et al., 2001; HU et al., 2007, 2010; JIANG et al., 2010; KLUG et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2008; ROH et al., 2010a, 2010b; UEDA et al., 2009). No caso dos fatores genéticos do vírus, muitos estudos mostram que a infecção por determinados tipos e variantes dos HPVs estão associados com o risco maior de desenvolver lesão e câncer cervical (BERUMEN et al., 2001; BURK et al., 2003; BURRONI et al., 2013; CHANG et al., 2011; CHANSAENROJ et al., 2012; CORNET et al., 2012, 2013; ELLIS et al., 1995; GHEIT et al., 2011; HO et al., 2005; LONDESBOROUGH et al., 1996; QUINT et al., 2010; SCHIFFMAN et al., 2010; SICHERO et al., 2007; VILLA et al., 2000; XI et al., 2007, 2012; YAMADA et al., 1997; ZEHBE et al., 2011; ZUNA et al., 2011).

2.3.5 Variantes dos HPVs

Estudos de heterogeneidade genética dos HPVs sugerem que alguns tipos, tais como o HPV16 e o HPV18, coevoluiram com as três maiores ramificações filogenéticas humana: Africana, Caucasiana e a Asiática. Além disso, as linhagens de HPV16 foram reagrupadas em cinco distintos grupos como Europeu (E), Asiático (As), Asiático-Americano (AA), Africano-1 (Af-1) e Africano 2 (Af-2) (HO et al., 1993; YAMADA et al., 1997). As linhagens de HPV18 foram agrupadas em três distintos grupos : Europeu (A), Asiático-Americano (AA) e o Africano (Af) (ARIAS-PULIDO et al., 2005; PRADO et al., 2005).

As variações genéticas observadas nos HPVs provavelmente não ocorrem como resultado de recombinação gênica, mas sim, do acúmulo das alterações nucleotídicas, sendo esse processo chamado de fixação de linhagem (variante). Assim, acredita-se que a acumulação de mutações leva a especiação dos HPVs, sendo permitido classificá-los em tipo, linhagens e sublinhagens (BURK et al., 2013; CORNET et al., 2012, 2013; SMITH et al., 2011).

Os HPVs16, 18, 31, 33 e 58 foram recentemente reclassificados em variantes e sublinhagens. Por exemplo, o HPV16 possui quatro variantes (A, B, C e D) e nove sublinhagens. O HPV18 é classificada em três variantes (A, B e C) e oito sublinhagens. O HPV31 possui três variantes (A, B e C) e sete sublinhagens. No que diz respeito ao HPV33, as análises filogenéticas sugerem três variantes (A, B e C) e cinco sublinhagens. O HPV58 possui quatro variantes (A, B, C e D) e sete sublinhagens (BURK et al., 2013; CORNET et al., 2012; SMITH et al., 2011).

Substituições de nucleotídeos podem culminar em variantes de HPVs que possuem um potencial oncogênico maior que outras variantes (CHAGAS et al., 2011, 2013; DE FREITAS et al., 2012; GURGEL et al., 2013a). Por exemplo, mudanças de nucleotídeos nos oncogenes E6 e E7 podem ser relevantes uma vez que podem alterar a ligação com proteínas celulares, interferindo na degradação e fosforilação da p53 e pRB, respectivamente (CHAGAS et al., 2011, 2013; VILLA et al., 2000). Da mesma forma, mudanças nucleotídicas no gene L1 podem alterar o reconhecimento do sistema imunológico aos epitopos imunogênicos (GURGEL et al., 2013a; PANDE et al., 2008; PILLAI et al., 2009). Além disso, polimorfismos no LCR podem alterar a ligação de fatores de transcrição (CORNET et al., 2012; RAIOL et al., 2009). Neste cenário, vários estudos foram realizados e demonstraram que as variantes de HPVs estão associados com oncogenicidade, persistência e a progressão da infecção (BERUMEN et al., 2001;

BURK et al., 2003; BURRONI et al., 2013; CHANG et al., 2011; CHANSAENROJ et al., 2012; CORNET et al., 2012, 2013; ELLIS et al., 1995; GHEIT et al., 2011; HO et al., 2005; LONDESBOROUGH et al., 1996; QUINT et al., 2010; SCHIFFMAN et al., 2010; SICHERO et al., 2007; VILLA et al., 2000; XI et al., 2007, 2012; YAMADA et al., 1997; ZEHBE et al., 2011; ZUNA et al., 2011).

2.3.5.1 Heterogeneidade genética do HPV16

Vários estudos têm mostrado uma associação entre a variante D do HPV16 e o risco de desenvolver lesão cervical e câncer cervical (BERUMEN et al., 2001; BURK et al., 2003; QUINT et al., 2010; ZUNA et al., 2011). Neste sentido, alterações nucleotídicas no oncogene E6 do HPV16 estão relacionado com a persistência viral e progressão de lesões cervicais (LONDESBOROUGH et al., 1996; XI et al., 1997, 1998). Por exemplo, o polimorfismo viral T350G, que leva a alteração na sequência de aminoácidos L83V da proteína E6 do HPV16, está associado com a persistência da infecção e progressão da lesão cervical (KÄMMER et al., 2002a; ZEHBE et al., 2001, 2011). Da mesma forma, pacientes infectadas com HPV16, contendo a alteração nucleotídica L83V, mostraram um percentual maior de persistência e progressão da lesão cervical quando comparadas com as pacientes infectadas com protótipo (GRODZKI et al., 2006). Na Indonésia, de Boer et al. mostraram que a variação nucleotídica A276G no gene E6, que leva a alteração N58S na sequência de aminoácido da proteína E6, é encontrada com mais frequência em casos de lesões cervicais quando comparadas com os protótipos (DE BOER et al., 2004). Além disso, algumas alterações nucleotídicas nos oncogenes E6 estão mapeadas em epitopos de células T e alteram o reconhecimento imunológico da célula infectada (ELLIS et al., 1995).

Com relação a proteína E7, um estudo mostrou que a alteração nucleotídica que resulta em Asp29Ser é mais frequente em pacientes com câncer cervical comparados aos pacientes com lesões cervicais e HPV16 positivo. Além disso, outro polimorfismo viral N29S foi significativamente mais frequente em carcinomas (70%) do que no grupo controle (33%) ou grupo de NIC III (50%) (SONG et al., 1997).

Como mencionado anteriormente, uma variação da sequência de nucleótidos dentro do gene L1 pode desempenhar um papel importante na estrutura do capsídeo, no reconhecimento imunológico e na neutralização viral (PANDE et al., 2008). Por exemplo, foi demonstrado que a variação His202, da proteína L1, é mais eficiente na automontagem das VLPs quando comparadas com o seu protótipo, Asp202 (KIRNBAUER et al., 1993b). Além disso, estudos funcionais mostraram que as variações nos resíduos 83-97 do gene L1 podem ter um impacto sobre o rendimento da proteína L1 (CHANSAENROJ et al., 2012).

Diversos estudos avaliaram a heterogeneidade genética de um fragmento ou da sequência completa do gene L1 do HPV16 (CENTO et al., 2009; DE BOER et al., 2004; FRATI et al., 2011; KIRNBAUER et al., 1993b; NTOVA et al., 2011; RAIOL et al., 2009; SHANG et al., 2011; SICHERO et al., 2007; SICHERO; VILLA, 2006; STEWART et al., 1996; SUN et al., 2011; TORNESELLO et al., 2004; WHEELER et al., 1997; YAMADA et al., 1997; YUE et al., 2013). Algumas destas alterações genéticas são mutações não-sinônimas e estão localizados em regiões imunodominantes hipervariáveis BC, DE, EF, FG, HI da proteína L1. Do mesmo modo, algumas destas alterações nucleotídicas estão situadas em regiões de epitopos de células B e células T (PILLAI et al., 2009).

As mudanças na sequência de nucleotídeos da LCR podem alterar a expressão dos oncogenes E6 e E7, bem como a replicação viral do DNA. Diversos estudos

mostram a heterogeneidade genética da LCR do HPV16 (ARIAS-PULIDO et al., 2005; BHATTACHARJEE; SENGUPTA, 2006; CENTO et al., 2011, 2012; CHANSAENROJ et al., 2012; DONG; PFISTER, 1999; ERIKSSON et al., 1999; GAGNON et al., 2007; KÄMMER et al., 2000, 2002a; KHOUADRI et al., 2006; LÓPEZ-REVILLA et al., 2009; NASIR et al., 2007; PANDE et al., 2008; PITTAYAKHAJONWUT; ANGELETTI, 2010; PRADO et al., 2005; RAIOL et al., 2009; SCHMIDT; KEDZIA; GOŹDZICKA-JÓZEFIAK, 2001; SHANG et al., 2011; SICHERO et al., 2007; VERESS et al., 1999). A variação genética G7521A da LCR do HPV16 foi encontrada com mais frequência em casos de lesões cervicais e câncer cervical quando comparados com o protótipo (BHATTACHARJEE; SENGUPTA, 2006; KÄMMER et al., 2000; PANDE et al., 2008; SHANG et al., 2011; TORNESELLO et al., 2004). Além disso, a variação G7521A está localizada em sítio de ligação do fator transcricional YY1. Estudos funcionais mostraram que essa variação aumenta a atividade do promotor p97 de três a seis vezes (DONG; PFISTER, 1999). Além disso, alterações genéticas encontradas na LCR da variante D do HPV16 possui um aumento de três vezes na atividade de promotor p97 em comparação com sequência protótipo (KÄMMER et al., 2000).

2.3.5.2 Heterogeneidade genética do HPV18

Estudos sugerem que determinadas linhagens do HPV18 também estão associadas com potencial oncogênico e persistência da infecção (ALTEKRUSE et al., 2003; BURK et al., 2003; SCHLECHT et al., 2005; SICHERO et al., 2007; XI et al., 2007). Como mencionado anteriormente, dados mundiais revelam que o HPV18 é o segundo genótipo mais comumente encontrado nos casos de câncer cervical, sendo mais relacionado com o adenocarcinoma do colo do útero (BESKOW et al., 2005; MUÑOZ

et al., 2003; TESHIMA et al., 1997). Em um estudo realizado no Brasil, Villa et al. observaram que as linhagens B e C do HPV18 estão associados com lesões HSIL (PRADO et al., 2005; VILLA et al., 2000). Além disso, estudos tem demonstrado que a presença do polimorfismo viral N129K do oncogene E6 do HPV18 é bastante conservada dentro de variantes oncogênicas B e C. Contudo, estudos funcionais demonstraram que N129K do gene E6 do HPV18 não aumenta a capacidade de degradação da p53 (CERQUEIRA et al., 2008; DE LA CRUZ-HERNÁNDEZ et al., 2005). No que diz respeito ao gene de L1, as alterações nucleotídicas A5503G, C5701G, C6470G, C6625G, C6842G foram observadas em dois estudos (ARIAS-PULIDO et al., 2005; SHEN et al., 2013). Estas variações estão perto do domínio C terminal da proteína L1, podendo afetar a resposta imunológica contra a proteína do capsídeo viral do HPV18 (ARIAS-PULIDO et al., 2005; FRATI et al., 2011). As alterações nucleotídicas A41G e T104C, na LCR do HPV18, aumentam a atividade do promotor p105, culminando no aumento da expressão de E6/E7 através da modulação SP1 e YY1 (CERQUEIRA et al., 2008). Além disso, a variabilidade genética na LCR aumenta de 2,64 a 8,18 vezes a expressão dos oncogenes E6/E7 quando comparados com a sequência protótipo (SICHERO; FRANCO; VILLA, 2005).

2.3.5.3 Heterogeneidade genética do HPV31

Atualmente, existem poucos estudos sobre a relevância clínica da heterogeneidade genética do HPV31 (CHAGAS et al., 2011, 2013; SCHIFFMAN et al., 2010; XI et al., 2012). No entanto, dois estudos recentes têm demonstrado que as linhagens A e B do HPV31 estão estatisticamente associadas com risco para HSIL (SCHIFFMAN et al., 2010; XI et al., 2012). Com relação ao gene E6, as variações genéticas nas posições 190 (A190G), 368 (A368G), 413 (C413T) e 537 (G537G) foram

detectadas e estão localizadas em possíveis regiões de epitopos de células T e/ou células B (CHAGAS et al., 2011, 2013). Do mesmo modo, variações genéticas observadas nas posições 67 (C67T), 136 (G136A), 184 (A184G) estão localizadas em epitopos de células T e/ou células B (CHAGAS et al., 2011). Além disso, as alterações nucleotídicas na LCR do HPV31 G7449A, G7457A, C7474T, G7525A T7575C estão inseridas em regiões de ligação para os factores de transcrição, que podem afetar a expressão de oncogenes E6 e E7 (CENTO et al., 2011).

2.3.5.4 Heterogeneidade genética do HPV33

Alguns estudos têm demonstrado a diversidade genética da LCR e dos genes E6, E7 e L1 do HPV33 (CORNUT et al., 2010; GAGNON et al., 2007; KHOUADRI et al., 2006; NTOVA et al., 2011; RAIOL et al., 2009; VRTAČNIK BOKAL et al., 2010). Contudo, apenas um estudo recente mostrou uma associação entre uma variante do HPV33 e o risco de desenvolver câncer cervical (GODÍNEZ et al., 2013). Além disso, em uma população japonesa, a variabilidade genética do gene E6 do HPV33 é mais freqüentemente observadas em NICI/II quando comparados com os casos de NICIII/ câncer cervical (XIN et al., 2001). Por outro lado, alterações nucleotídicas na LCR de HPV33 foram significativamente associados com HSIL nas populações brasileiras e canadenses (KHOUADRI et al., 2006). A variação C7732G, que resulta na perda de um sítio de ligação do fator transcricional NF-1, foi significativamente associada com os casos de HSIL (KHOUADRI et al., 2006).

2.3.5.5 Heterogeneidade genética do HPV58

Estudos de variabilidade genética do HPV58 e a sua relação com o desenvolvimento de lesões e câncer cervical ainda são escassos (CENTO et al., 2011; CERQUEIRA et al., 2003; CHAN et al., 2002; DING et al., 2010; RAIOL et al., 2009; WU et al., 2006; XIN et al., 2001). Embora existam um grande número de publicações que têm explorado a heterogeneidade genética deste genótipo, não há informações precisas sobre a prevalência de diferentes variantes do HPV58 e o possível risco no desenvolvimento do câncer cervical. Uma alta frequência de HPV58 tem sido observada na Asia Oriental e na América do Sul (LIU et al., 2014).

Um estudo demonstrou que pacientes com polimorfismos virais do oncogene E7 do HPV58 C632T (T20I) e E7 G760A (G63S) estão 6,5 vezes mais associados com HSIL (DING et al., 2010). Além disso, o polimorfismo viral do oncogene E7 G41R é mais frequente em casos de NICII/III e tem sido associado a um aumento do risco oncogênico (CHAN et al., 2002).

No que diz respeito à LCR do HPV58, foi observada uma associação significativa entre os polimorfismos virais T7207A, C7284G, T7345C, T7369G, T431G e T7483G e casos de citologia cervical anormal (CENTO et al., 2011). Além disso, algumas destas mutações estão situadas em sítios de ligação de fatores transcricionais, que podem afetar a transcrição dos oncogenes E6 e E7 (CENTO et al., 2011).

Dessa maneira, estudos tem mostrado que mudanças genéticas na LCR dos HR HPV podem resultar em perda ou ganho de sítios de ligação dos fatores transcricionais, alterando, portanto, a expressão dos oncogenes E6 e E7. Além disso, variabilidade genética no gene L1 pode ter um impacto na conformação do capsídeo viral, além de alterar a resposta imune contra o vírus. Contudo, apesar da importância, não existem

estudos de variabilidade genética da LCR e do gene L1 de amostras circulantes no Nordeste do Brasil (Figura 12).

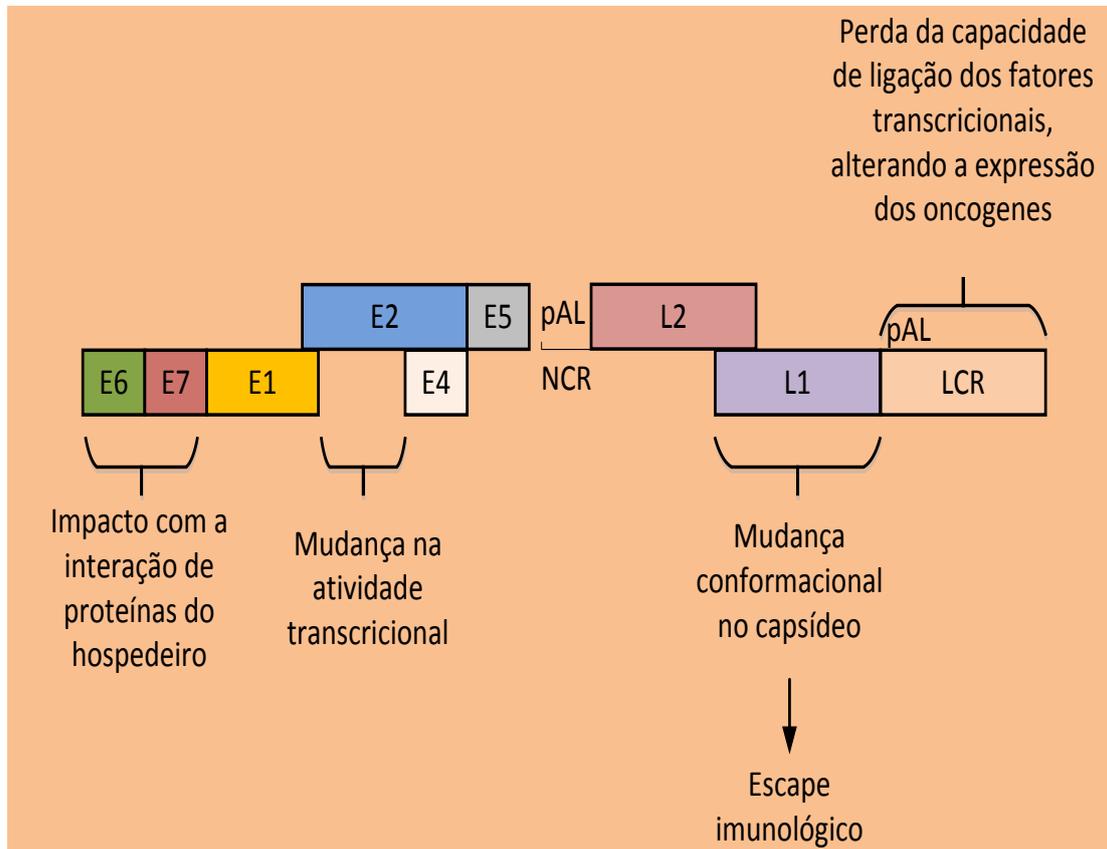


Figura 12. Genoma do HPV, no formato linear. Diversas evidências mostram que alterações nucleotídicas nos genes E6, E7 L1 e na LCR dos HR HPV estão associados com a persistência da infecção e progressão da lesão, levando a crer que algumas variantes de HPVs são mais oncogênicas que outras.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo foi ampliar o conhecimento acerca da variabilidade genética do gene L1 e da LCR dos HPVs detectados nos Estados de Pernambuco, Alagoas e Sergipe, localizados no Nordeste do Brasil. Além disso, análises *in silico* das variações bem como um estudo de associação entre os polimorfismos virais e a susceptibilidade para lesões cervicais foram realizadas para verificar as possíveis repercussões destas alterações nucleotídicas em pacientes oriundas do Nordeste Brasileiro.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Analisar dados sobre variabilidade genética do gene L1 dos HPVs 16, 31, 53, 54, 56, 58, 66, 70 e 81 encontrados no Estado de Pernambuco, Alagoas e Sergipe, Nordeste do Brasil;

3.2.3 Analisar dados sobre variabilidade genética da LCR dos HPVs 16, 31, e 58 encontrados no Estado de Pernambuco, Alagoas e Sergipe, Nordeste do Brasil;

3.2.5 Analisar se as mudanças nucleotídicas nos genes L1 dos HPVs 16, 31 e 58 estão inseridas em possíveis regiões de epitopos imunogênicos.

3.2.4 Analisar se as mudanças nucleotídicas na LCR estão inseridas em possíveis sítios de ligação de fatores transcricionais celular e viral;

3.2.6 Realizar a análise filogenética dos HPVs 16, 31 e 58, baseados na região da LCR destes vírus.

3.2.7 Realizar uma análise de associação entre marcadores virais encontrados no gene L1 do HPV16 e a susceptibilidade para lesões cervicais.

4. Material e Métodos

4.1 População de estudo

O presente estudo, de caráter transversal, foi realizado com pacientes dos seguintes serviços de saúde localizados em regiões metropolitanas do Nordeste Brasileiro: (1) Hospital Oswaldo Cruz, situado na cidade do Recife, Estado de Pernambuco; (2) Unidade de Medicina Integrada, situado na cidade de Aracaju, Estado do Sergipe; (3) Serviço de citologia e colposcopia Dra. Anália Lôbo e o Posto de Atendimento Médico Salgadinho, ambos localizados em Maceió, Estado de Alagoas. A amostra deste estudo é constituída de mulheres com idades entre 15 e 77 anos, todas sexualmente ativas. A duração das coletas que resultaram no presente estudo se estendeu entre Janeiro de 2009 a Agosto de 2012.

4.2 Critérios de elegibilidade

As pacientes sexualmente ativas, brasileiras e residentes das regiões metropolitanas do Estado de Pernambuco, Alagoas e Sérgipe, foram elegíveis para este estudo. Após terem sido informadas sobre os objetivos do estudo, todas as pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ver Apêndice I). Os critérios de exclusão para este estudo foram os seguintes: Pacientes portadoras do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e recusa da assinatura no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.3 Entrevista

Todas as pacientes consideradas elegíveis foram entrevistadas pelas alunas de Pós-Graduação da Universidade Federal de Pernambuco Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel, Bárbara Simas Chagas e Carolina Medeiros do Amaral. Também realizaram a

entrevista a aluna Ivi Santos, da Universidade Federal do Sergipe e o aluno Daniel Passos, da Universidade Federal de Alagoas. Todas as entrevistas foram realizadas pessoalmente, utilizando-se um questionário epidemiológico estruturado, que incluíam informações pessoais da paciente, tais como número de parceiros, manifestações de outras DSTs e uso de anticoncepcional (ver Apêndice II).

4.4 Citologia oncótica da cérvix

Após a entrevista, as médicas ginecologistas Eugênia Maria de Albuquerque e Ivi Santos realizaram o exame pélvico e colheram amostras de células esfoliadas cervicais com o uso de uma escova cervical apropriada (*Cytobrush*). O raspado cervical foi conservado em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e armazenadas a -20°C, até a etapa posterior de extração do DNA viral. Além disso, outra coleta foi realizada para a análise da citologia oncótica. Para tal, as células esfoliadas foram distribuídas em lâminas, fixadas em álcool absoluto e coradas pelo método Papanicolaou. Em seguida, procedeu-se a leitura das lâminas pelos Patologistas de cada serviço de saúde acima mencionados. Os resultados foram registrados de acordo com a classificação de Bethesda.

4.5 Extração do DNA viral

Em todas as amostras do raspado cervical foram extraídos o DNA e, em seguida, armazenadas a -20°C. A extração do DNA genômico e viral foi efetuada utilizando o kit de extração *GenominPrepBlood DNA isolation* (AmeshanBioscience), obedecendo as instruções do fabricante. Posteriormente, todas as amostras foram quantificadas utilizando um espectrofotômetro (NanoVue Plus Spectrophotometer).

A detecção do DNA dos tipos de HPVs e a verificação da qualidade do DNA amostral obtido foram realizados através da técnica *Polimerase Chain Reaction* (PCR). Como controle endógeno e da integridade do DNA, foi realizada a amplificação do gene *WAF-1*, que codifica a proteína p21 do genoma humano. Para a reação de PCR do gene *WAF-1*, foram utilizados os seguintes pares de primers *Forward*: 5'-CCCAGGGAAGGGTGTCTG-3' e *Reverse*: 5'-GGGCGGCCAG GGTATGTAC-3', conforme descrito por Amaral *et al.* (AMARAL *et al.*, 2014). A PCR foi realizada utilizando 50ng de DNA genômico, 20 pmol de cada oligonucleotídeo e 1X solução Master Mix (Promega). A reação de amplificação obedeceu as seguintes condições: 1 ciclo de 94°C por 5 minutos para a desnaturação inicial do material genômico, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 66°C por 45 segundos para o anelamento, 72 °C por 1 minuto para a extensão e 1 ciclo de 72 °C por 5 minutos para a extensão final do fragmento. Em seguida, o produto foi analisado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

4.6 Detecção do DNA do HPV

Para a detecção do DNA do HPV, foi utilizada a PCR com o conjunto de primers consenso e degenerado MY09/11 (MY09: CGTCCMARRGGAWACTG ATC e MY11: GCMCAGGGWCATAAYAATGG). Os primers MY09/11 foram utilizados no presente estudo pois amplificam uma sequência parcial de 450pb altamente conservada do gene L1 de 47 Papilomavírus (GRAVITT *et al.*, 2000). As condições de amplificação da sequência do gene L1 com os primers MY09/11 foram as seguintes: 25µl de volume final, 150ng DNA, 15 pmol de cada oligonucleotídeo e 1X solução Master Mix (Promega). A amplificação ocorreu em 35 ciclos com 95°C durante 30 segundos para a desnaturação, 55°C durante 40 segundos para o anelamento, 72°C

durante 45 segundos para a extensão e um ciclo com 72°C durante 5 minutos para a extensão final. Após a amplificação, o produto da PCR foi analisado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

4.7 Genotipagem do HPV

Todas as amostras positivas para o DNA do HPV foram submetidas ao sequenciamento com a finalidade de confirmar os resultados obtidos com as PCRs bem como tipificar os HPVs. Para tal, todas as amostras positivas para o DNA do HPV foram purificadas, utilizando-se um protocolo *in house* com etanol/isopropanol. Em seguida, as amostras positivas para o DNA do HPV foram sequenciadas pelo método dideoxi-terminal fluorescente, utilizando o kit ABI PRISM *BigDye*TM *Terminator Cycle Sequencing v 3.1 Ready Reaction* (Applied Biosystems®). O sequenciamento das amostras foi realizado na Plataforma Multiusuária de Sequenciamento e Análise de Expressão Gênica do Laboratório Central, Universidade Federal de Pernambuco. Foi utilizado o sequenciador automático de DNA ABI Prism 3100 (Applied Biosystem®), de acordo com os padrões estabelecidos nesta unidade. As reações de sequenciamento foram realizadas com os mesmos pares de *primers* utilizados para a detecção do DNA do HPV.

Subsequentemente, as sequências obtidas foram alinhadas utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Após o alinhamento, as sequências obtidas foram comparadas às sequências de referências, depositadas no *GeneBank*. Dessa maneira, a determinação do tipo de HPV foi realizada através da similaridade das sequências obtidas com as sequências depositadas na biblioteca genômica. Foram selecionadas

todas as amostras de HPV que possuíram um nível de similaridade de 98 a 100% com a sequências presentes no *GeneBank*.

4.8 PCR tipo-específica

Para a confirmação da tipificação utilizando-se o método PCR/sequenciamento, foram realizadas reações de PCR tipo-específico, utilizando *primers* desenhados para flanquear as regiões das LCRs e do gene L1 dos HPVs 16, 18, 31, 33 e 58 (Tabela 1). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25µl, contendo 100ng DNA, 20 pmol de cada oligonucleotídeo, 1X solução Master Mix (Promega). As amplificações das LCRs dos HPVs 16, 18, 31, 33, 58 foram realizadas em 35 ciclos com 95°C durante 30 segundos para a desnaturação, 55°C durante 40 segundos para o anelamento, 72°C durante 2 minutos para a extensão e um ciclo de extensão final a 72°C durante 10 minutos. Em seguida, os produtos de amplificação contendo a L1 e a LCR foram analisados em géis de agarose 1% corados com brometo de etídio.

Todas as amostras positivas para o DNA do HPVs 16, 18, 31, 33 e 58 foram submetidas ao sequenciamento da LCR e do gene L1 com a finalidade de confirmar os resultados obtidos com as PCRs tipo-específica e PCR/sequenciamento.

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados para a amplificação do gene L1 e LCR dos HPV's 16, 18, 31, 33 e 58.

Tipo de HPV	Região Amplificada	Sequência do primer
HPV16	L1	5'- ACGGTACCCAGGTGACTTTTATTTACATCC - 3' 5' - TAAGTCGACCAGCTTACGTTTTTTGC - 3'
	LCR	5'- TTCTGCAGACCTAGATCAGTTTC - 3' 5'- GTGCATAACTGTGGTAACTTTCTGG - 3'
HPV18	L1	5'ATACCACTCCCAGTACCA3' 5'TGGTATGTATGGTTGTTGTTGT3'
	LCR	F: 5' TTAGATCAATATCCCCTTGGACG- 3' R: 5'-GATCAGGTAGCTTGTAGGGT- 3'
HPV31	L1	5'GATTTCGAAAAAATGTCTCTGTGGC 3' 5' TAAGTCGACCTTTTGTAGTTTTTTTACG 3'
	LCR	5' TACCTCCAAAGGAAAAGGAAGACCC 3' 5' TTGGCACAAATCATGCAATGTTTCG 3'
HPV33	L1	5'ATGGTATTTGTTGGGGCA 3' 5' TGCTTGCCCTACCCTGCAT 3'
	LCR	F: 5' TACCTCCAAAGGAAAAGGAAGACCC 3'

R: 5' TTG GCACAAATCATGCAATGTTTCG 3'

HPV58

L1

5' AACCTGGTCCAGACATTGCATC 3'

5' CCACCAAACGCAAAAAGGTTA 3'

LCR

5' ATGTTCTATGTCCTTGTCAG 3'

5' TTGCCAGGTGTGGACTAA 3'

4.9 Análise da variabilidade genética do gene L1

O sequenciamento do gene L1 dos HPVs 53, 54, 56, 61, 62, 66, 70 e 81 foi realizado com a estratégia PCR/sequenciamento dos fragmentos de 450pb obtidos com o uso dos primers MY09/11. Além disso, os três tipos mais frequentemente observados de HPVs na população estudada (16, 31 e 58) foram sujeitos à análise de variabilidade do gene L1 com um tamanho de fragmento superior a 800pb (primers descritos na tabela 1). As condições de amplificação do gene L1 foram semelhantes ao descrito no item 4.7.

4.10 Análise da variabilidade genética da LCR

A amplificação de fragmentos correspondentes aos LCR dos três tipos mais prevalentes de HPVs também foi realizado, utilizando-se os primers descritos na Tabela 1. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25µl, contendo 100ng DNA, 20 pmol de cada oligonucleotídeo e 1X Master Mix (Promega). As amplificações foram realizadas em 35 ciclos com 95°C durante 30 segundos para a desnaturação, 55°C durante 40 segundos para o anelamento, 72°C durante 2 minutos para a extensão e um ciclo de extensão final a 72°C durante 10 minutos. Em seguida, os produtos de amplificação contendo fragmentos das LCR foram analisados em géis de agarose 1% corados com brometo de etídio.

4.11 Análise das sequências de DNA obtidas

As montagens dos *contigs* referentes às sequências obtidas de DNA dos HPVs foram contruídas através dos programas Gap4 (versão 4.0) e Pregap4 (versão 1.5), do pacote Staden (STADEN, 1996). De forma geral, a ferramenta Pregap4 realiza o pré-

processamento dos eletroferogramas obtidos, através do controle da qualidade da sequência e conversão de formatos. Para a análise de variabilidade, foi atribuído um valor do PHRED de 30 para cada base das sequências analisadas. O Gap4 caracteriza-se por alinhar as sequências obtidas (*forward* e *reverse*), formando um *contig*. Após a montagem dos *contigs*, as sequências de DNA obtidas foram comparadas às sequências de DNA dos protótipos, depositados no *GeneBank*, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. As sequências protótipos foram as seguintes: HPV16 (K02718), HPV31 (J04353), HPV53 (NC_001593.1), HPV54 (NC_001676.1), HPV56 (X74483.1), HPV58 (D90400), HPV61 (U31793.1), HPV62 (AY395706), HPV66 (U31794.1), HPV70 (U21941.1) e HPV81 (AJ620209). A comparação das sequências foi realizada usando o BLAST, disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Os alinhamentos de várias sequências do DNA dos HPVs foram realizados utilizando o programa CLUSTALW (Mega 5.2, versão Beta) (TAMURA et al., 2011).

4.12 Análise filogenética

Para a análise filogenética, foram utilizados as sequências de DNA da LCR dos HPVs 16, 31 e 58 do presente estudo juntamente com as sequências previamente descritas por BURK et al. (2013) (Tabela 2), depositados no GeneBank. As construções das árvores filogenéticas foram realizadas com fragmentos de LCR contendo 759, 783 e 696 para os genótipos 16, 31 e 58, respectivamente. Para fins de análise filogenética, a LCR é mais robusta quando comparada a região de L1, podendo ser identificado além do tipo viral, a variante e, no caso do HPV16, a sublinhagem (sub variante) (SMITH et al., 2011). Para tal, foram utilizados os algoritmos Neighbor-Joining e Kimura 2

parameter, com 1000 repetições de *bootstrap*, usando o pacote MEGA, versão 5.2 (TAMURA et al., 2011).

As sequências parciais das LCRs dos HPVs 16, 31 e 58 foram depositadas no GenBank, sob os seguintes números de acesso: HPV16 LCR: KJ452220-452242; HPV31 LCR: KJ435060-435067; HPV58 LCR: KJ567247-467252. Do mesmo modo, as sequências parciais do gene L1 foram depositadas no GeneBank, sob os seguintes números de acesso: HPV16 LI (KJ467225-467238), HPV31 L1 (KJ452216-452219), HPV53 L1 (JX912952), HPV54 L1 (JX912948), HPV56 (JX912947), HPV58 L1 (KJ467239-477246), HPV62 L1 (JX912951), HPV70 L1 (JX912950) e HPV81 (JX912949).

Tabela 2. Sequências de referências utilizadas para a construção das árvores filogenéticas dos HPVs 16, 31 e 58 circulantes no Nordeste do Brasil.

Sequência de referência (GeneBank, N° de acesso)	Tipo de HPV/Linhagem	Referências
K02718	HPV16/A	(BURK et al., 2013)
AF536179	HPV16/A	
HQ644236	HPV16/A	
AF534061	HPV16/A	
AF536180	HPV16/B	
HQ644298	HPV16/B	
AF472509	HPV16/C	
HQ644257	HPV16/D	
AY686579	HPV16/D	
AF402678	HPV16/D	
J04353	HPV31/A	(BURK et al., 2013)

HQ537675	HPV31/A	
HQ537676	HPV31/B	
HQ537680	HPV31/B	
HQ537682	HPV31/C	
HQ537684	HPV31/C	
HQ537685	HPV31/C	
D90400	HPV58/A	(BURK et al., 2013)
HQ537752	HPV58/A	
HQ537758	HPV58/A	
HQ537762	HPV58/B	
HQ537764	HPV58/B	
HQ537774	HPV58/C	
HQ537768	HPV58/D	
HQ537770	HPV58/D	

4.13 Predição de epítopos de células B e de células T

O possível impacto das variações encontradas nos genes L1 dos HPVs 16, 31, 53, 54, 56, 58, 61, 62, 66, 70 e 81 foi estimado através de análises, *in silico*, que prediz as regiões de epítopos imunogênicos de células B e de células T. No presente estudo, considerou-se que mudanças nas sequências de aminoácidos da proteína L1 dos HPVs 16, 31, 53, 54, 56, 58, 61, 62, 66, 70 e 81, que estavam localizadas na região de epítopos de células B e de células T, poderiam afetar a afinidade de ligação dos anticorpos neutralizantes e, no caso das células T, não iniciar uma resposta imune específica. Assim, a predição dos epítopos de célula B foi realizada por meio do servidor BcePred, que está disponível em <http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/>. A predição dos

epítomos de célula T foi realizada por meio dos servidores ProPred e ProPred I. O servidor ProPred I realiza predição de regiões de MHC Classe I (<http://www.imtech.res.in/raghava/propred1/>). O servidor ProPred realiza predição de regiões de MHC Classe II (<http://www.imtech.res.in/raghava/propred/>) (SINGH; RAGHAVA, 2001, 2003).

4.14 Predição de sítios de ligação de fatores transcricionais

A predição de sítios de ligação dos fatores transcricionais das LCRs dos HPVs 16, 31 e 58, foi realizada através do servidor PROMO (http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3). Para tal, a sequência das LCRs protótipos foram utilizadas para gerar as possíveis regiões de ligação dos fatores transcricionais. Tanto o fator transcricional viral E2 quanto os fatores transcricionais celulares foram analisados. Os fatores transcricionais celulares foram os seguintes: AP-1, NF-1, Oct-1, YY1, C/EBPbeta e SP-1. Os fatores de transcrição foram previstos dentro de uma margem de dissimilaridade inferior ou igual a 15% (FARRE et al., 2003).

4.15 Análise de associação entre marcadores virais do HPV16 e as lesões cervicais

Cinco variações, sinônimas e não sinônimas, no gene L1 do HPV16 foram selecionadas para a análise de associação caso-controle. Para tal, foram incluídas no grupo “*controle*” as pacientes sem lesões cervicais, mas portadoras do HPV16. Por outro lado, no grupo denominado “*casos*”, foram incluídas pacientes com lesões cervical LSIL ou HSIL e portadoras do HPV16.

4.16 Análise estatística

Teste de qui quadrado de Pearson foi realizado para comparar os grupos de caso e controle com relação aos marcadores virais. Para estimar a associação entre os marcadores virais e um risco para lesões cervicais, foi calculada a Odds Ratio (OR). Um valor $p < 0,05$ foi considerado estaticamente significativo. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa UNPHASED v.3.121 .

4.17 Considerações éticas

Os protocolos do presente estudo foram submetidos à aprovação do Comitê de Ética da Universidade de Pernambuco (CAAE: 0058.0.106.000-10, HUOC/PROCAPE 64/2010), Universidade Federal de Alagoas (UFAL 004650/2010-55) e Universidade Federal do Sergipe (CAAE: 0483.0.172.000-11, CEP/CCS/UFPE N° 491/11) (Apêndice III).

5. Resultados

5.1 Características da população estudada

No presente estudo, foram incluídas 784 pacientes, sendo 169/784 oriundas da região metropolitana do Recife, Estado de Pernambuco; 515/784 oriundas da região metropolitana de Maceió, Estado de Alagoas e 94/784 oriundas da região metropolitana de Aracaju, Estado de Sergipe.

A média etária das 784 pacientes foi de 34,13 anos (variando de 15 a 77 anos). Na Tabela 3, encontra-se a distribuição das pacientes de acordo com o uso ou não de anticoncepcional, número de parceiros e histórico de doenças sexualmente transmissíveis (DSTs). Cerca de 73% das pacientes declararam não fazer uso de anticoncepcional, enquanto 23% declararam usar anticoncepcional como método contraceptivo. Cerca de 46% das pacientes declararam ter apenas 1 parceiro durante toda vida, 21% declararam ter apenas dois parceiros, 13% declararam ter 3 parceiros, 7% declararam ter 4 parceiros e 10,5% declararam ter tido acima de 5 parceiros (Tabela 3).

Tabela 3: Distribuição das 784 pacientes de acordo com o uso de anticoncepcional, número de parceiros e histórico de DSTs.

Características	No.	%
Uso de anticoncepcional		
Sim	210	26,8%
Não	574	73,2%
Número de parceiros		
1	367	46,8%
2	171	21,8%
3	109	13,9%
4	55	7,1%
5	38	4,8%
6	11	1,4%
7	4	0,5%
8	1	0,1%
10	6	0,7%
11	1	0,1%
15	1	0,1%
16	1	0,1%
20	1	0,1%
Não sabe	18	2,2%
Histórico de DSTs		
Sim	273	34,8%
Não	487	62,1%
Não sabe	24	3%

5.2 Resultados da citologia oncótica

Os resultados da citologia oncótica mostraram que um total de 42,8% das pacientes não apresentaram lesões cervicais, enquanto 57,2% tinham alguma lesão ou câncer na cérvix. Um percentual de 0,8% das pacientes apresentaram células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS), e 0,3% das pacientes apresentaram atipia de células glandulares (AGUS). Cerca de 1,1% do total das pacientes tinham lesões condilomatosas, 25,4% das pacientes tinham LSIL, 24,6%

apresentaram HSIL e 5% tinham câncer cervical durante o período de coleta das amostras.

5.3 Prevalência de infecção genital por HPV

A presença do DNA do HPV nas células esfoliadas da região cervical foi avaliada em 784 pacientes. Deste total, 29% (224/784) foram positivas para o DNA do HPV (Figura 13). Dentre as amostras positivas para o DNA do HPV, 82,6% (185/224) estavam infectadas por apenas um tipo de HPV, enquanto 17,41% (39/224) apresentavam infecções múltiplas por HPVs (Figura 14).

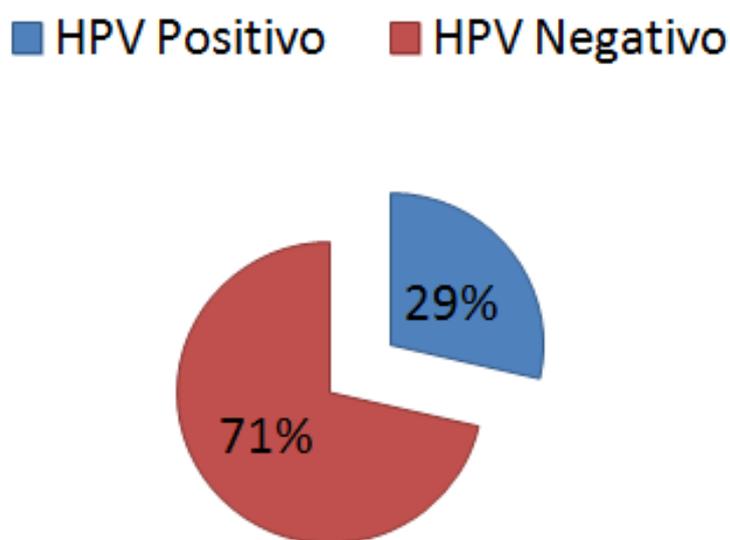


Figura 13. Prevalência do DNA do HPV em 784 amostras cervicais oriundas da região Nordeste do Brasil. Em uma população de 784 pacientes, foi observado uma prevalência de 29% do DNA do HPV em amostras do raspado cervical.

■ 1 tipo de HPV ■ Múltiplos tipos de HPV

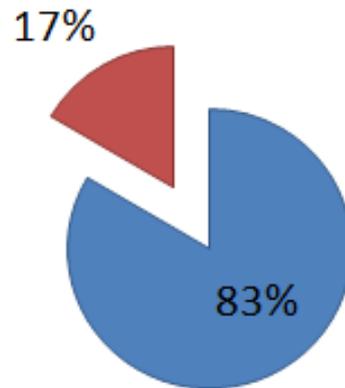


Figura 14: Prevalência de infecções únicas e múltiplas em 224 pacientes oriundas da região Nordeste do Brasil. As amostras positivas para o DNA do HPV foram investigadas quanto a presença de múltiplos tipos de HPV. Foi observado que um percentual de 17% das pacientes apresentavam infecções múltiplas causadas por distintos HPV.

Foram detectados 23 tipos de HPV, nomeadamente: HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 53, 54, 56, 58, 61, 62, 66, 70, 72, 81, 82, 83 e 84 (Figura 15). Os cinco genótipos virais mais frequentes foram os seguintes: HPV16 (31,9%), HPV31 (16,1%), HPV58 (15,3%), HPV70 (5,51%) e os HPV33 e HPV6 (cada um com um percentual de 4,33%) (Tabela 4). O total de frequência de todos os tipos de HPV estão descritas na Tabela3.

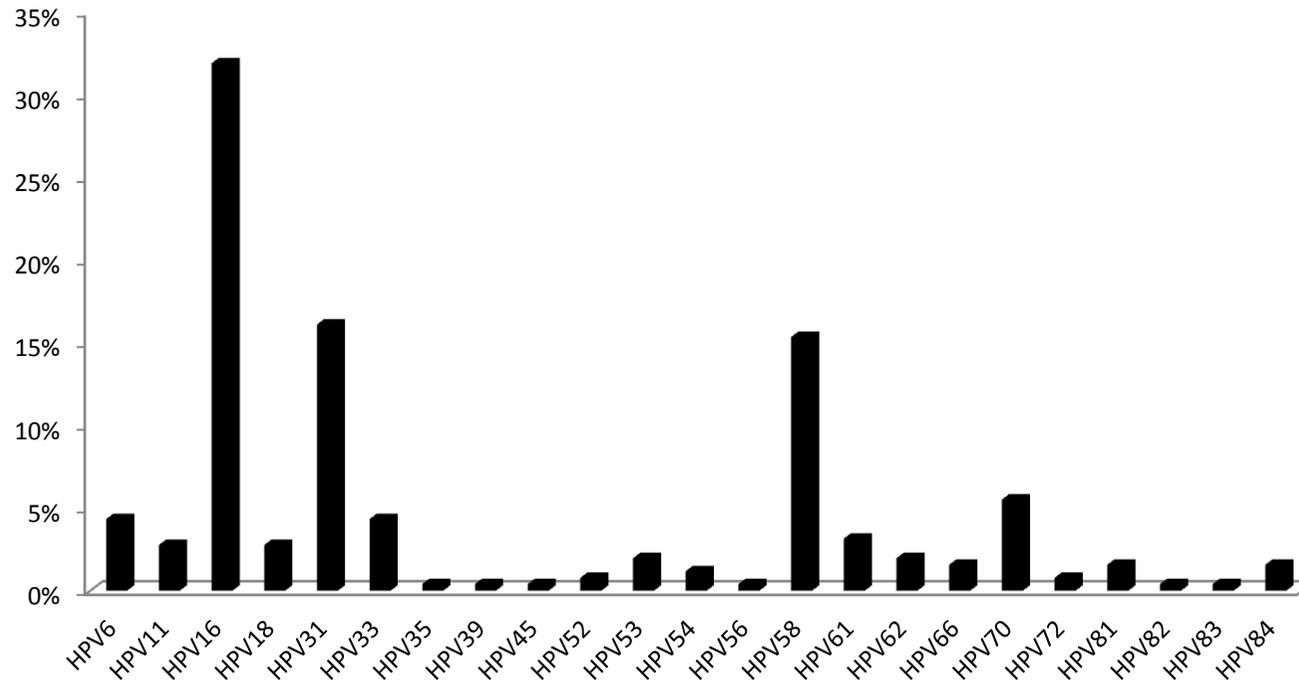


Figura 15. Distribuição dos HPVs encontrados na Região Nordeste do Brasil, em uma população de 784 pacientes. Os HPVs 16, 31, 58, 70, 33 e 6 foram os seis mais prevalentes na população estudada.

Tabela 4. Frequência dos HPVs encontrados na Região Nordeste do Brasil, em uma população de 784 pacientes. Observa-se que os HPVs 16, 31, 58 e 70 são os mais prevalentes.

Tipo de HPV	Prevalência (%)
HPV6	4,3%
HPV11	2,8%
HPV16	31,9%
HPV18	2,8%
HPV31	16,1%
HPV33	4,3%
HPV35	0,4%
HPV39	0,4%
HPV45	0,4%
HPV52	0,8%
HPV53	2%
HPV54	1,2%
HPV56	0,4%
HPV58	15,3%
HPV61	3,1%
HPV62	2%
HPV66	1,6%
HPV70	5,5%
HPV72	0,8%
HPV81	1,6%
HPV82	0,4%
HPV83	0,4%
HPV84	1,6%

Com relação a distribuição dos Alpha-PVs na região do Nordeste Brasileiro, foi observado uma elevada presença de espécies de Alpha-9 (69,2%), seguidos de Alpha-3 (9,48%), Alpha-7 (9,1%), Alpha-10 (7,11%), Alpha-6 (3,5%), Alpha-13 (1,18%) e Alpha-5 (0,4%), como observado na Figura 16.

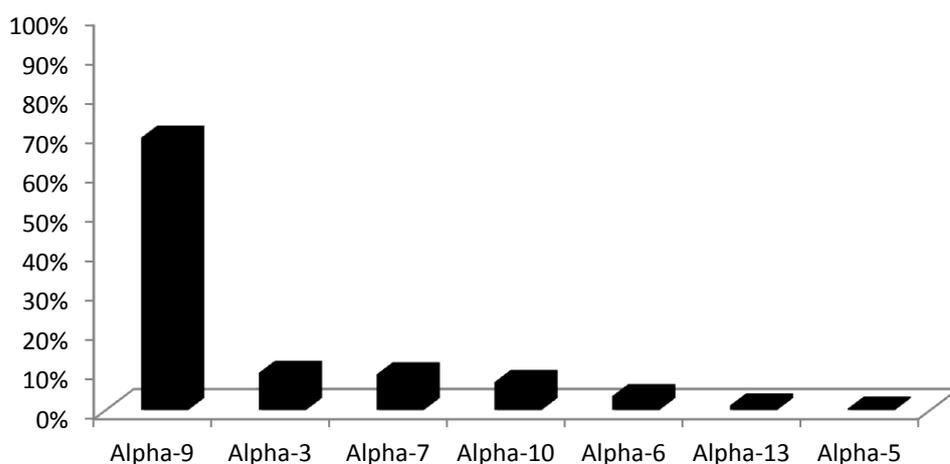


Figura 16. Distribuição das espécies de Alpha-PVs encontrados na Região Nordeste do Brasil, em uma população de 784 pacientes. A espécie Alpha-9 é a mais prevalente, seguida das espécies Alpha-3, Alpha-7 e Alpha-10.

5.4 Análise de variabilidade genética do gene L1 de onze genótipos de HPV

A análise de variabilidade genética do gene L1 dos HPVs 16, 31, 53, 54, 56, 58, 61, 62, 66, 70 e 81 revelaram um total de noventa e oito alterações genéticas, sendo 96/98 substituições, 1/98 deleção e 1/98 inserção de nucleotídeos. Além disso, 8,1% (8/98) das variações nucleotídicas foram descritas pela primeira vez na literatura. Um total de 29,6% (29/98) das variações detectadas no presente estudo são caracterizadas como não sinônimas. Dentre estas, um total de 18,36% (18/98) são variações não sinônimas que levam a alteração de aminoácidos em regiões de epitopos de células B,

25,5% (25/98) são variações não sinônimas localizadas em regiões de MHC Classe I e 18,36% (18/98) são variações não sinônimas localizadas em região de MHC Classe II. A seguir, estão descritas todas as alterações genéticas em fragmentos parciais do gene L1 dos genótipos de HPV supracitados.

5.4.1 Gene L1 do HPV16

A análise da heterogeneidade genética do gene L1 do HPV16 foi realizada em um fragmento contendo 1300pb. A Tabela 5 apresenta as variações nucleotídicas encontradas no gene L1 do HPV16 circulante no Nordeste do Brasil. Foram observadas 23 variações nucleotídicas, sendo 10/23 (43,5%) caracterizadas como variações não sinônimas. Em um total de 50% (5/10) das variações não sinônimas, foram observadas mudanças na sequência de aminoácidos, localizadas em regiões imunodominantes da proteína L1 quando comparado com a sequência protótipo K02718.1. Além disso, em 20% (2/10) das variações não sinônimas observaram-se mudanças de aminoácidos em regiões de formação de VLPs da proteína L1. Ademais, a análise de predição dos epítopos revelou que 80% das variações não sinônimas levam a mudanças de aminoácidos na proteína L1 em regiões de epítopos de MHC-Classe I, 50% em regiões de MHC Classe II e 40% em células B. Não foram observados a presença de *stop codons* nos fragmentos de L1 do HPV16 analisados.

5.4.2 Gene L1 do HPV31

A análise da heterogeneidade genética do gene L1 do HPV31 foi realizada em um fragmento contendo 809pb. A Tabela 6 apresenta as variações sinônimas e não

sinônimas encontradas no gene L1 do HPV 31, circulante no Nordeste do Brasil. Foram observadas nove variações nucleotídica, sendo 7/9 (77,7%) destas caracterizadas como variações sinônimas e 2/9 (22,2%) caracterizadas como variações não sinônimas quando comparadas com a sequência protótipo J04353. Nestas duas variações não sinônimas foram observadas alterações de aminoácidos em regiões de imunodominância da proteína L1 do HPV31, quando comparadas com a sequência protótipo. Além disso, a análise de predição dos epitopos revelou que 100% das variações não sinônimas levam a mudanças de aminoácidos na proteína L1 em regiões de epitopos de MHC-Classe I, 50% em regiões de MHC Classe II e 50% em células B. Não foram observados a presença de *stop codons* nos fragmentos de L1 do HPV31 analisados.

Tabela 5. Variações nucleotídicas do gene L1 do HPV16. A tabela mostra as posições das variações nucleotídica no genoma viral, na proteína e o possível impacto biológico com a análise de possíveis regiões de epitopos imunogênicos. (-) Variação sinônima comparadas à sequência protótipo K02718.1. Del: Deleção de nucleotídeos. Ins: inserção de nucleotídeos. H: Histidina; Y: Tirosina; T: Treonina; N: Asparagina; D: Ácido Aspartico; A: Alanina; S: Serina; P: Prolina; Q: Glutamina.

Posição no genoma viral	Variação	Mudança de aminoácido	Posição na protein	No de isolados	Possível impacto biológico
5862	C/T	H102Y	β-C	5/14	MHC Classe-I/ MHC Classe-II
5909	T/C	-		5/14	
5981	G/A	-		1/14	
6023	A/T	-		1/14	
6163	C/A	T202N	Alça EF	5/14	Células B/ MHC Classe-I
6176	A/C	N207T	Alça EF	2/14	Células B/ MHC Classe-I/ MHC Classe-II
6240	C/G	H228D	Alça EF	14/14	Células B/ MHC Classe-I
6245	T/C	-		5/14	
6300	A/C	-		1/14	
6315	A/G	-		4/14	
6436	A/G	T292A	Alça FG	5/14	MHC Classe-I/ MHC Classe-II
6484	T/C	-		1/14	
6561	C/T	S308P		5/14	
6570	T/G	-		1/14	
6697	A/C	T379P	Alça HI	5/14	Células B/ MHC Classe-I
6723	G/A	-		5/14	

6805	A/T	T415S	$\alpha 2$	1/14	MHC Classe-I/ MHC Classe-II/ Formação de VLPs
6856	C/T	-		5/14	
6867	C/T	-		5/14	
6903	Ins ATC	Ins T and S 448	$\alpha 4$	14/14	MHC Classe-I/ MHC Classe-II/ Formação de VLPs
6955	Del GAT	Del D 465	$\alpha 4$ - β -J		
6972	C/T	-		5/14	
6996	G/A	-		5/14	

Tabela 6. Variações nucleotídicas do gene L1 do HPV31. A tabela mostra as posições das variações nucleotídica no genoma viral, na proteína e o possível impacto biológico destas alterações nucleotídicas através da análise de possíveis regiões de epitopos imunogênicos. (-) Variação sinônima comparada à sequência protótipo J04353. T: treonina; N: asparagina; A: alanina.

Posição no genoma viral	Variação	Mudança de aminoácido	Posição da alteração na proteína	Nº of isolates	Possível impacto biológico
5926	A/G	-		1/4	
5927	T/C	-		1/4	
6025	A/G	T267A	Alça FG	1/4	MHC Classe-I/ MHC Classe-II
6091	C/T	-		1/4	
6335	G/A	-		1/4	
6357	A/G	-		1/4	
6374	C/T	-		1/4	
6379	C/A	T274N	Alça FG	1/4	Células B/ MHC Classe-I
6593	T/G	-		1/4	

5.4.3 Gene L1 do HPV53

A análise de variabilidade do gene L1 do HPV53 foi realizada em um fragmento contendo 450pb. Foi observada uma variante molecular contendo seis alterações nucleotídicas quando comparadas com a sequência protótipo NC_001593.1. Dentre estas alterações, foi observada apenas uma variação não sinônima, C6942T, que leva a uma mudança na sequência de aminoácido da proteína L1 (P430S). Análises, *in silico*, mostraram que a alteração de Prolina por Serina na posição 430 da proteína L1 do HPV53 está inserida em possíveis regiões de epitopos de células T e células B (ver Tabela 7). Não foram observados a presença de *stop codons* nos fragmentos de L1 do HPV53 analisados.

Tabela 7. Variações nucleotídicas do gene L1 do HPV53. A tabela mostra as posições das variações nucleotídica no genoma viral, na proteína e o possível impacto biológico destas alterações nucleotídicas através da análise de possíveis regiões de epitopos imunogênicos. (-) Variação sinônima comparada à sequência protótipo NC_001593.1. S: Serina; P: Prolina.

	6	6	6	6	6	7
	6	7	7	9	9	0
Gene L1 do HPV53	8	0	4	1	4	0
	6	6	4	3	7	3
Protótipo (NC_001593.1)	C	C	A	G	C	G
6 SE	T	T	G	A	T	A
Proteína	-	-	-	-	-	P430S
Posição de alteração na proteína	-	-	-	-	-	β J- α 4 hélice
Possível impacto biológico	-	-	-	-	-	MHC Classe-I/ Células B

5.4.4 Gene L1 do HPV54

A análise de variabilidade do gene L1 do HPV54 foi realizada em um fragmento contendo 450pb. Foi observada uma variante molecular contendo seis alterações nucleotídicas quando comparadas com a sequência protótipo NC_001676.1. As variações A6622T e T6625C, não sinônima e sinônima respectivamente, foram descritas pela primeira vez na literatura. Três alterações não sinônimas foram observadas no gene L1, levando a duas alterações na sequência da proteína L1, nomeadamente Q313H e S333T. Análises, *in silico*, revelaram que estas alterações podem estar inseridas em possíveis regiões de células B e células T (ver Tabela 8). Não foram observados a presença de *stop codons* nos fragmentos de L1 do HPV54 analisados.

Tabela 8. Variações nucleotídicas do gene L1 do HPV54. A tabela mostra as posições das variações nucleotídica no genoma viral, na proteína e o possível impacto biológico destas alterações nucleotídicas através da análise de possíveis regiões de epitópos imunogênicos. (-) Variação sinônima comparadas à sequência protótipo NC_001676.1. H: histidina; Q: glutamina; T: treonina; S: serina. (*) Variações descritas pela primeira vez.

Gene L1 do HPV54	6	6	6	6	6	6
	5	5	6	6	6	9
	5	7	2	2	2	7
	2	9	2	4	5	5
Protótipo (NC_001676.1)	A	G	A	A	T	C
233 PE	T	A	T*	T	C*	T
Proteína	Q313H	-	T337S	T337S	-	-
Posição da alteração na proteína	G2	-	β-H1	β-H1	-	-
Possível impacto biológico	MHC Classe-I/ MHC Classe-II/ Células B	-	MHC Classe-I/ MHC Classe-II/ Células B	MHC Classe-I/ MHC Classe-II/ Células B	-	-

5.4.5 Gene L1 do HPV56

A análise de variabilidade do gene L1 do HPV56 foi realizada em um fragmento contendo 450pb. Não foram observadas alteração nucleotídicas no gene L1 do HPV56 quando comparadas com as sequências protótipos X74483.1. Além disso, não foram observados a presença de *stop codons* nos fragmentos de L1 do HPV56 analisados.

5.4.6 Gene L1 do HPV58

A variabilidade do gene L1 do HPV58 foi realizada em um fragmento contendo 1264pb. Os resultados mostraram trinta e cinco alterações nucleotídicas, sendo 20% destas alterações (7/35) variações não sinônimas quando comparadas com a sequência protótipo D90400. As alterações nucleotídicas mais comuns foram A6540G (I335M), C6828A (N422D), A6014C (L150F), G5994A (V144I), A6799G (I412V), G6823A (D420N) e C6689A (T375N). Um total de 8% das variações genéticas detectadas no gene L1 levam a alteração de aminoácidos da proteína L1 em regiões de imunodominância. Além disso, 8% das alterações genéticas encontradas estão localizadas em regiões de formação de VLPs. Ademais, 71,4% (5/7) das variações não sinônimas apresentam alterações na sequência de aminoácidos em regiões de ligação dos epitopos de células B, 85,7% (6/7) em regiões de MHC Classe I e 71,4% (5/7) em regiões de MHC de Classe II (ver Tabela 9). Não foram observados a presença de *stop codons* nos fragmentos de L1 do HPV58 analisados.

Tabela 9. Variações nucleotídicas do gene L1 do HPV58. A tabela mostra as posições das variações nucleotídica no genoma viral, na proteína e o possível impacto biológico destas alterações nucleotídicas através da análise de possíveis regiões de epítopos imunogênicos. (-) Variações sinônimas comparadas à sequência protótipo D90400. T: Treonina; N: Asparagina; D: Ácido Aspartico; V: Valina; I: Isoleucina; L: Leucina; F: Fenilalanina; M: Metionina.

Posição no genoma	Variação	Mudança de aminoácido	Nº de isolados	Posição da alteração na proteína	Possível impacto biológico
5593	C/T	-	2/8		
5747	T/C	-	1/8		
5789	T/C	-	1/8		
5801	A/G	-	1/8		
5819	A/G	-	1/8		
5861	C/G	-	1/8		
5939	G/A	-	1/8		
5994	G/A	V144I	3/8	Alça DE	Células B MHC Classe-I
6014	A/C	L150F	5/8	Alça DE	Células B MHC Class-II
6038	C/T	-	1/8		
6039	A/G	-	1/8		
6046	G/A	-	1/8		
6051	C/A	-	1/8		

6172	A/G	-	1/8		
6206	G/A	-	1/8		
6222	A/G	-	1/8		
6405	G/A	-	4/8		
6417	A/G	-	4/8		
6435	T/C	-	4/8		
6440	A/C	-	1/8		
6441	A/C	-	1/8		
6459	G/A	-	1/8		
6459	G/T	-	1/8		
6460	G/A	-	1/8		
6497	T/G	-	1/8		
6497	C/T	-	1/8		
6540	A/G	I325M	6/8	β -G1	MHC Classe-I/ MHC Classe-II
6642	G/A	-	4/8		
6689	C/A	T375N	2/8	Alça HI	Células B MHC Classe-I/ MHC Classe-II
6693	G/A	-	1/8		
6698	G/A	-	1/8		
6712	G/A	-	1/8		

6799	A/G	I412V		$\alpha 2$	MHC Classe-I/ Formação de VLPs
6823	G/A	D420N	3/8	$\alpha 3$	Células B MHC Classe-I/ MHC Classe-II/ Formação de VLPs
6828	C/A	N422D	2/8	$\alpha 3$	Células B/ MHC Classe-I/ MHC Classe-II/ Formação de VLPs
6829	A/G	-	4/8		Formação de VLPs
			3/8		

5.4.7 Gene L1 do HPV 61

A variabilidade do gene L1 do HPV61 foi realizada em um fragmento contendo 450pb. Os resultados da análise de variabilidade genética não revelaram alteração nucleotídicas quando comparadas com as sequências protótipos U31793. Ademais, não foram observados a presença de *stop codons* nos fragmentos de L1 do HPV61 analisados.

5.4.8 Gene L1 do HPV62

Com relação ao gene L1 do HPV62, foram observadas nove alterações nucleotídicas, dos quais cinco (55,5%) são alterações não sinônimas. Dentre estas variações não sinônimas, duas são descritas pela primeira vez: A6838C e A6921G, que leva às alterações E354D e Q382R na sequência de aminoácidos do gene L1 do HPV62, respectivamente. Ademais, 60% (3/5) das variações não sinônimas apresentam alterações na sequência de aminoácidos em regiões de ligação dos epitopos de células B, 80% (4/5) em regiões de MHC Classe I e 100% (5/5) em regiões de MHC de Classe II (ver Tabela 10). Além disso, não foram observados a presença de *stop codons* nos fragmentos de L1 do HPV62 analisados.

Tabela 10. Variações nucleotídicas do gene L1 do HPV62. A tabela mostra as posições das variações nucleotídica no genoma viral, na proteína e o possível impacto biológico destas alterações nucleotídicas através da análise de possíveis regiões de epitopos imunogênicos. (-) Variação sinônima comparada à sequência protótipo AY395706. E: Ácido Glutâmico; D: Ácido Aspartico; A: Alanina; T: Treonina; Q: Glutamina; R: Arginina. (*) Variação descrita pela primeira vez.

Gene L1 do HPV62	6	6	6	6	6	6	7	7	7
	7	8	8	8	9	9	0	1	1
	6	2	3	4	2	2	5	1	5
	3	7	8	7	1	5	5	4	9
Protótipo (AY395706)	A	G	A	T	A	A	A	A	C
165 PE	C	A	C*	C	G*	G	G	C	T
Proteína	E329D	A351T	E354D		Q382R	-	T427A	-	-
Posição da alteração na proteína	β -H1	HI	HI	-	β 1- α 2	-	α 2	-	-
Possível impacto biológico	MHC Classe-I/ MHC Classe-II/ Células B	MHC Classe-I/ MHC Classe-II	MHC Classe-II/ Células B		MHC Classe-I/ MHC Classe-II/ Células B	-	MHC Classe-I/ MHC Classe-II	-	-

5.4.9 Gene L1 do HPV 66

Com relação ao gene L1 do HPV66, foram observadas duas variações sinônimas, nomeadamente A6666G e A6987G. Ademais, não foram observados a presença de *stop codons* nos fragmentos de L1 do HPV66 analisados.

5.4.10 Gene L1 do HPV70

A análise de variabilidade genética do gene L1 do HPV70 mostrou cinco variações, sendo três descritas pela primeira vez. A variação A6886G leva a alteração de aminoácido na posição T433A. Além disso, essa alteração está inserida em regiões de epitopos de células B e células T (ver Tabela 11). Ademais, não foram observados a presença de *stop codons* nos fragmentos de L1 do HPV70 analisados.

Tabela 11. Variações nucleotídicas do gene L1 do HPV70. A tabela mostra as posições das variações nucleotídica no genoma viral, na proteína e o possível impacto biológico destas alterações nucleotídicas através da análise de possíveis regiões de epitopos imunogênicos. (-) Variação sinônima comparada à sequência protótipo HPU21941. T: Treonina; A: Alanina. (*) Variações nucleotídicas descritas pela primeira vez.

Gene L1 do HPV70	6	6	6	6	6
	6	7	8	8	8
	3	4	0	7	8
	3	1	1	3	6
Protótipo (HPU21941)	G	T	A	A	A
41 PE	A	-	-	-	-
42 PE	A	A	C*	G*	G*
Protein	-	-	-	-	T433A
Posição da alteração na proteína	-	-	-	-	β-H1
Função biológica	-	-	-	-	MHC Classe-I Células B

5.4.11 Gene L1 do HPV81

A análise de heterogeneidade genética do gene L1 do HPV81 permitiu observar duas mutações sinônimas descritas pela primeira vez na literatura, nomeadamente A7184G e T7249A. Ademais, não foram observados a presença de *stop codons* nos fragmentos de L1 do HPV81 analisados.

5.5. Análise de variabilidade genética da LCR dos HPVs 16, 31 e 58

Para a análise da diversidade genética da LCR, foram incluídos os três genótipos de HPV mais frequentes encontrados neste estudo, nomeadamente o HPV16, 31 e 58. A análise de variabilidade genética da LCR dos genótipos de HPVs supracitados revelaram um total de noventa e cinco alterações genéticas, sendo 88/95 substituições, 5/98 deleções e 2/95 inserções de nucleotídeos. Além disso, 3,1% (3/95) das variações nucleotídicas foram descritas pela primeira vez na literatura. Um total de 51,5 % (49/95) das variações detectadas no presente estudo estão inseridas em sítios de ligação dos fatores transcricionais. Dentre estas, um total de 28,5% (14/49) são variações que estavam inseridas em sítios de ligação do fator transcricional C/EBP beta; 30% (15/49) das variações estavam inseridas em sítios de ligação do fator transcricional YY1; 10,2% (5/49) das variações estavam inseridas em sítios de ligação do fator transcricional AP-1; 20,4% (10/49) das variações estavam inseridas em sítios de ligação do fator transcricional NF-1; 14, 3% (7/49) das variações estavam inseridas em sítios de ligação do fator transcricional viral E2; e 8,1% (4/49) das variações estavam inseridas em sítios de ligação do fator transcricional Oct-1. A seguir, estão descritas todas as alterações genéticas observadas nos fragmentos parciais da LCR dos HPVs 16, 31 e 58.

5.5.1 LCR do HPV16

A análise de variabilidade da LCR do HPV16 revelou que 24/30 (80%) das variações nucleotídicas estavam inseridas em regiões de ligação dos fatores transcricional celular e viral. As variações mais comuns foram a insC7434, C7436G e delA7869, encontradas em todas as amostras analisadas. As variações insC7434, C7436G estão inseridas em regiões de ligação dos fatores transcripcionais celulares YY1, NF-1, enquanto a delA7869 está inserida na região de ligação do fator transcricional viral E2.

Ainda, a variação G7521A foi encontrada em 43,5% do total de amostras, seguidas por A7489C (39,1%), G7493A (39,1%), C7693A (39,1%), C7768T (39,1%), C7790T (39,1%). As variações C7693A e C7790T estão localizadas em regiões de ligações dos fatores transcripcionais E2 e YY1, respectivamente (ver Tabela 12).

Tabela 12. Análise de variabilidade genética da LCR do HPV16 comparada à sequência protótipo K02718.1. A Tabela também mostra as regiões de possíveis ligações dos fatores transcripcionais. Ins: Inserção; Del: Deleção.

Posição no genoma	Varição nucleotídica	No de isolados	Fator transcricional
7175	A/C	1/23	C/EBPbeta
7194	G/T	10/23	
7229	A/C	1/23	C/EBPbeta
7234	A/C	10/23	
7258	G/A	1/23	YY1
7281	G/T	1/23	
7316	A/C	1/23	YY1, AP-1
7340	A/T	7/23	C/EBPbeta
7360	A/G	1/23	
7361	G/C	1/23	
7395	C/T	7/23	C/EBPbeta
7434	Ins C	23/23	NF-1, YY1
7436	C/G	23/23	YY1
7441	T/G	1/23	YY1
7485	A/C	9/23	NF1

7490	G/A	9/23	
7521	G/A	10/23	YY1
7670	C/T	9/23	
7690	C/A	9/23	E2
7730	A/C	8/23	Oct-1
7730	A/T	1/23	Oct-1
7747	T/G	7/23	C/EBPbeta
7768	C/T	9/23	NF-1
7790	C/T	1/23	YY1
7790	C/T	9/23	YY1
7838	G/T	2/23	C/EBPbeta
7869	Del A	23/23	E2
7874	G/A	1/23	NF-1
7881	C/A	1/23	C/EBPbeta
7891	C/G	7/23	C/EBPbeta

5.5.2 LCR do HPV31

Com relação à LCR do HPV31, foram observadas trinta mudanças nucleotídicas, sendo que 47% (14/30) estão situadas em regiões de ligação dos fatores transcricionais viral e celular. A variação mais comum foi a deleção de 10pb (100% das amostras), localizada em sítio de ligação do fator transcricional NF-1. As variações C7480T e T7871G foram encontradas em 20% das amostras e estão localizadas em regiões de ligação do fator transcricional E2. Além disso, a variação T7190A foi descrita pela primeira vez e está inserida na região de ligação do fator transcricional C/EBPbeta (ver Tabela 13).

Tabela 13. Análise de variabilidade da sequência nucleotídica da LCR do HPV31 em comparação com a sequência protótipo J04353.1. A Tabela também mostra as regiões de possíveis ligações dos fatores transcricionais. Del: Deleção. (*) Alteração descrita pela primeira vez.

Posição no genoma	Variação nucleotídica	No de isolados	Fator transcricional
7157	A/G	1/8	YY1
7190	T/A*	1/8	C/EBPbeta
7305	Del CTATTTTATA	2/8	
7311	T/C	1/8	
7334	T/C	3/8	
7338	A/G	7/8	
7341	Del TGTTCCTGCT	8/8	NF-1
7360	A/G	3/8	AP-1, NF-1
7375	T/C	1/8	
7378	G/C	3/8	
7389	A/C*	1/8	
7390	G/A	5/8	
7400	C/A	3/8	YY1, NF-1
7455	G/A	3/8	YY1
7456	A/C	2/8	YY1
7463	G/A	3/8	
7476	A/C	1/8	
7480	C/T	2/8	E2
7512	C/T	2/8	C/EBPbeta
7521	C/A	1/8	C/EBPbeta
7531	G/A	3/8	
7539	T/C	1/8	E2
7581	T/C	3/8	NF-1
7648	C/A	1/8	AP-1
7665	T/G	1/8	
7713	A/G	1/8	
7716	C/T	2/8	
7755	A/C	2/8	
7760	C/A	2/8	
7871	T/G	2/8	E2

5.5.3 LCR do HPV58

A análise de variabilidade genética da LCR do HPV58 revelou que 34,8% (12/35) das variações encontradas estão localizadas em regiões de ligação dos fatores transcricionais viral e celular. As variações nucleotídicas mais comuns foram C7745A e A7794G, encontradas em 50% das amostras e inseridas em sítios de ligação dos fatores NF-1 e E2, respectivamente (ver Tabela 14).

Tabela 14. Análise de variabilidade genética da LCR do HPV58 comparado à sequência protótipo D90400.1. A Tabela também mostra as regiões de possíveis ligações dos fatores transcricionais. Del: Deleção. Ins: Inserção. (*) Alteração descrita pela primeira vez.

Posição no genoma	Variação nucleotídica	Nº de isolados	Fator transcricional
7150	G/T	1/6	
7169	Del TATACAT*	1/6	
7187	T/C	1/6	
7188	T/A	1/6	
7189	A/C	1/6	
7189	Del A	1/6	
7188	Del TATGT	1/6	
7197	G/C	1/6	
7202	C/T	1/6	
7210	T/A	3/6	
7233	G/A	1/6	
7244	C/A	1/6	YY1
7268	C/G	1/6	YY1
7269	C/T	2/6	YY1
7283	Ins TGTCAGTTTCCT	1/6	
7299	C/G	3/6	
7319	A/G	1/6	
7347	G/A	1/6	Oct-1, C/EBPbeta
7360	T/C	1/6	NF-1
7384	T/G	1/6	C/EBPbeta

7410	G/A	1/6	
7436	G/A	1/6	Oct-1, C/EBPbeta
7444	T/G	1/6	
7446	T/G	1/6	
7450	A/G	1/6	
7498	T/G	1/6	
7537	T/C	2/6	
7701	G/A	1/6	
7729	A/C	1/6	
7739	A/G	2/6	
7745	C/A	3/6	NF-1
7760	G/C	1/6	AP-1
7760	A/G	1/6	AP-1
7793	T/C	1/6	E2
7794	A/G	3/6	E2

5.6 Análise Filogenética dos HPVs 16, 31 e 58

5.6.1 HPV16

A análise filogenética da LCR do HPV16 foi realizada com base em um fragmento contendo 759pb de 32 amostras, sendo 22 do Nordeste do Brasil e 10 oriundas do GeneBank. Os resultados revelaram que 63,63% (14/22) das amostras são variantes pertencentes a variante A, enquanto 36,36% são pertencentes a variante D. Nas amostras analisadas, não foram encontradas variantes pertencentes as linhagens B ou C do HPV16 (ver Figura 17).

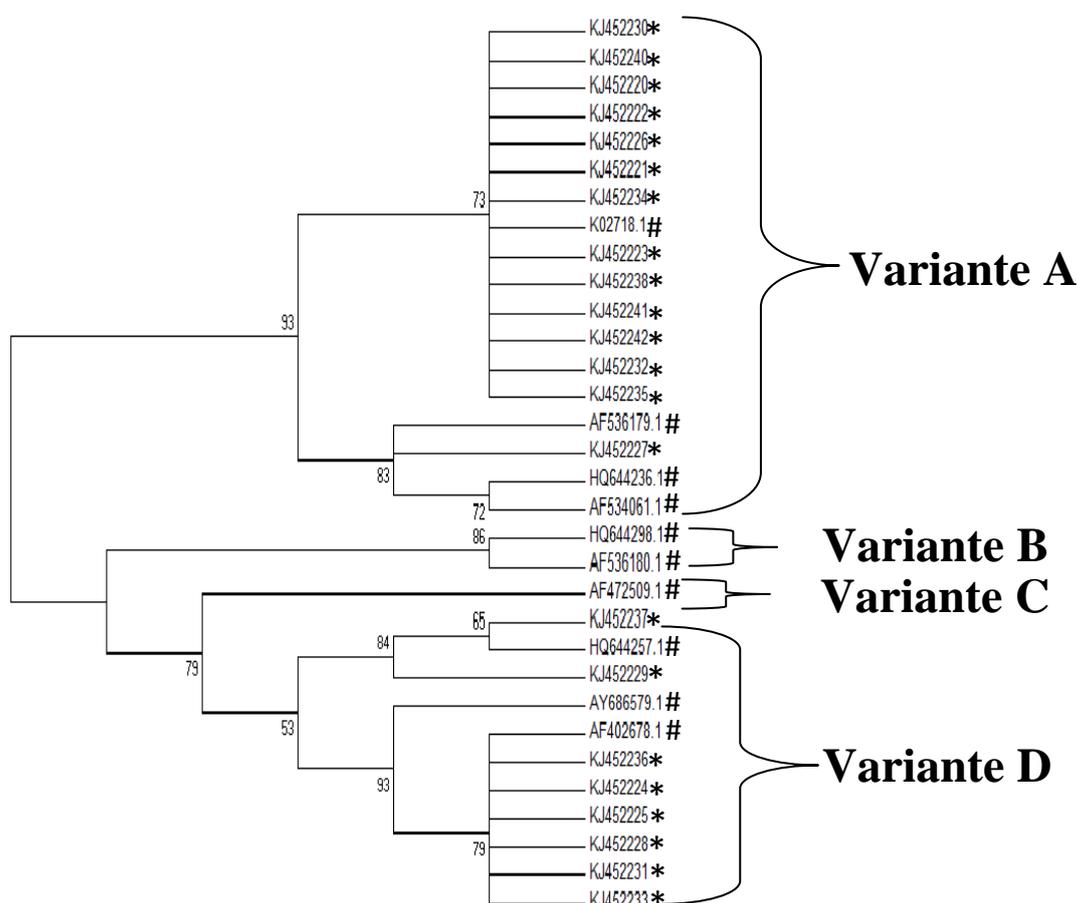


Figura 17. Análise filogenética do HPV16. Além das amostras do presente estudo, foram utilizadas as amostras descritas por Burk et al., 2013. Foi utilizado o algoritmo Neighbor Joining para a construção da árvore filogenética, baseada em um fragmento de 759pb da LCR. Quatro linhagens foram identificadas: A, B, C e D. (*) Variantes virais encontradas no presente estudo (KJ452220-452242), pertencentes às linhagens A e D. (#) Amostras descritas por Burk et al., 2013. Os valores nos ramos correspondem aos valores de bootstrap acima de 50%, com 1000 réplicas.

5.6.2 HPV31

A análise filogenética da LCR do HPV31 foi realizada com base em um fragmento contendo 783pb de 15 amostras, sendo 8 do Nordeste do Brasil e 7 oriundas do GeneBank. A análise filogenética dos fragmentos da LCR do HPV31 revelou que 62,5% (5/8) das amostras pertencem a variante A, enquanto 37,5% são pertencem a variante C. Nas amostras analisadas, não foram encontradas variantes pertencente a linhagem B do HPV16 (ver Figura 18).

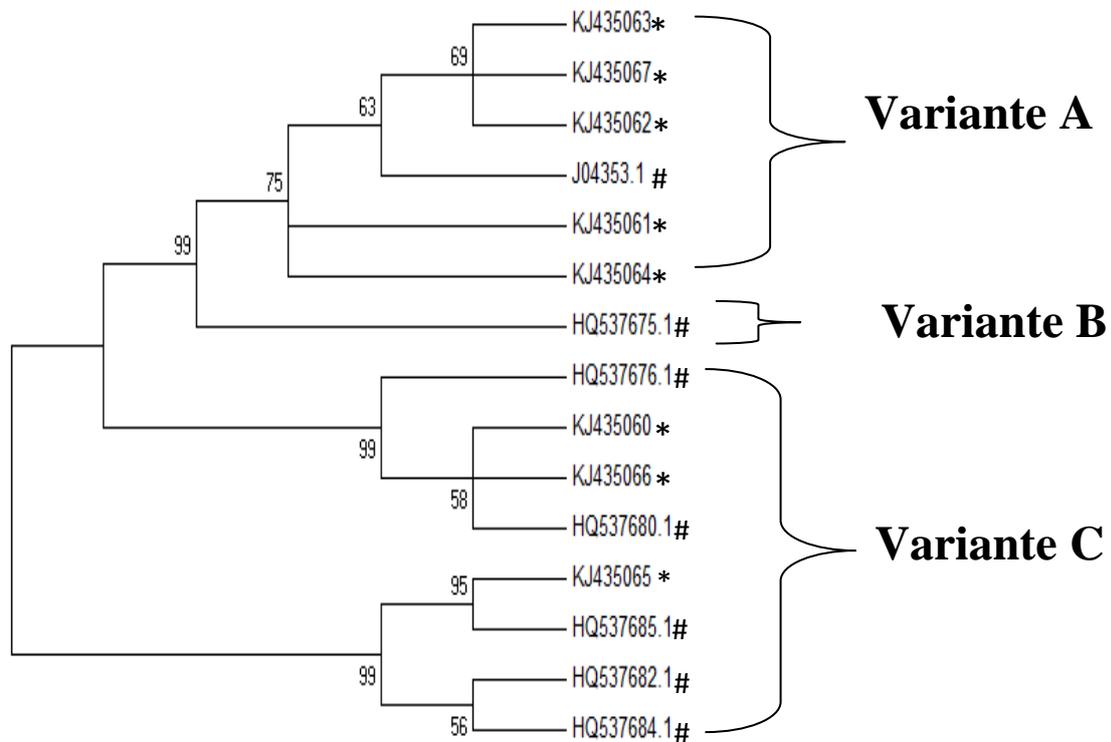


Figura 18. Análise filogenética do HPV31. Além das amostras do presente estudo, foram utilizadas as amostras descritas por Burk et al., 2013. Foi utilizado o algoritmo Neighbor Joining para a construção da árvore filogenética, baseada em um fragmento de 783pb da LCR. Três linhagens foram identificadas: A, B e C. (*) Variantes virais encontradas no presente estudo (KJ435060-KJ435067) pertencem às linhagens A e C. (#) Amostras descritas por Burk et al., 2013. Os valores nos ramos correspondem aos valores de bootstrap acima de 50%, com 1000 réplicas.

5.6.3 HPV58

A análise filogenética da LCR do HPV58 foi realizada com base em um fragmento contendo 696pb de 14 amostras, sendo 6 do Nordeste do Brasil e 9 oriundas do GeneBank. A análise filogenética dos fragmentos da LCR do HPV58 revelou que 50% (3/6) das amostras pertencem a variante A, enquanto 16,6 % pertencem às linhagens B, C e D (ver Figura 19).

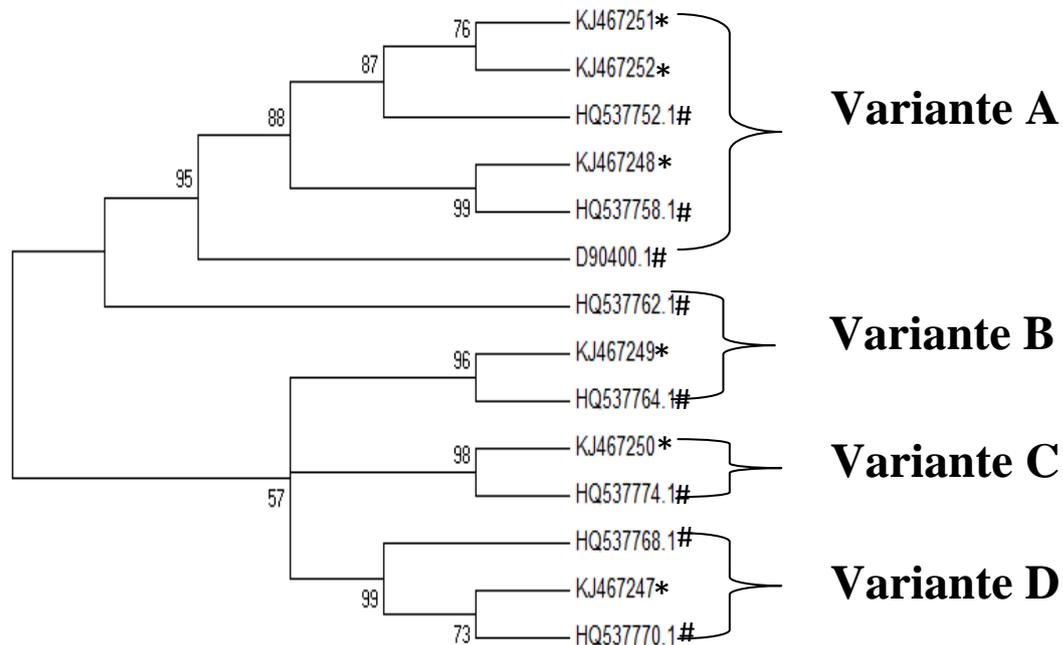


Figure 19. Análise filogenética do HPV58. Além das amostras do presente estudo, foram utilizadas as amostras descritas por Burk et al., 2013. Foi utilizado o algoritmo Neighbor Joining para a construção da árvore filogenética, baseada em um fragmento de 696pb da LCR. Quatro linhagens foram identificadas: A, B, C e D. (*) As variantes virais encontradas no presente estudo (KJ467247-KJ467252) pertencem às linhagens A, B, C e D. (#) Amostras descritas por Burk et al., 2013. Os valores nos ramos correspondem aos valores de bootstrap acima de 50%, com 1000 réplicas.

5.7 Análise de associação entre marcadores do HPV16 e a susceptibilidade para lesões cervicais

5.7.1 Polimorfismos do gene L1 do HPV16

A presente investigação conduziu um estudo de associação do tipo caso-controle com os polimorfismos virais A6697C, G6723A, A6805T, C6856T C6862T do gene L1 do HPV16 e a susceptibilidade para lesões cervicais, em uma população do Nordeste Brasileiro. Para tanto, foram genotipados cinquenta amostras, sendo 19 amostras do grupo controle (pacientes sem lesão cervical e HPV16 positivas) e 31 casos (pacientes sem lesão cervical e HPV16 positivas). As análises de associação dos polimorfismos A6697C, G6723A, A6805T, C6856T C6862T do gene L1 do HPV16 não revelaram diferença significativa na frequência alélica entre os grupos caso e controle. As análises de associação também não foram significativas ao estratificar o grupo casos em LSIL e HSIL (ver Tabela 15).

Contudo, uma associação significativa foi observada quando há a combinação de dois alelos dos polimorfismos A6697C/A6805T (CA, $p=0.02$, OR 4.57), G6723A/A6805T (AA, $p=0.004$, OR 6.73), e A6805T/C6862T (TC, $p=0.02$, OR 4.57) (Table 3). O mesmo foi observado na combinação contendo três alelos A6697C/G6723/A6805T (CAA, $p=0.02$, OR 5.053), A6697C/A6805T/C6862T (CAT, $p=0.02$, OR 4.57), G6723A/A6805T/C6856T (AAT, $p=0.004$, OR 6.316), G6723/A6805T/C6862T (AAT, $p=0.02$, OR 5.053).

A combinação com quatro alelos dos polimorfismos A6697C, G6723A, A6805 e C6856T (CAAT, $p=0.02$, OR 4.73); A6697C, G6723A, A6805T e C6862T (CAAT, $p=0.02$, OR 5.053), G6723A, A6805T, C6856T e C6862T (AATT, $p=0.02$, OR 4.73) também foi significativa. Por fim, foi realizada uma análise de associação com cinco

alelos combinados A6697C, G6723A, A6805T, C6856T e C6862T (CAATT, $p=0.02$, OR 4.73), que também foi significativa (ver Tabela 16).

Tabela 15. Frequência dos alelos dos polimorfismos virais A6697C, G6723A, A6805T, C6856T e C6862T encontrados no gene L1 do HPV16. HW: Equilíbrio de Hardy-Weinberg

	Casos vs Controle				LSIL vs HSIL		Qui quadrado (χ^2)	Valor de <i>P</i>
	Caso/Controle	Qui quadrado (χ^2)	Valor de <i>P</i>	LSIL/HSIL	HW			
A6697C								
A	0.7 – 0.76	0.48	0.48	0.68 – 0.72	< 0.0001	0.12	0.72	
C	0.3 – 0.24			0.32 – 0.28	< 0.0001			
G6723A								
G	0.63 – 0.76	1.93	0.16	0.63 – 0.63	< 0.0001	0.001	0.97	
A	0.36 – 0.23			0.37 – 0.37	< 0.0001			
A6805T								
A	0.9 – 0.81	1.67	0.19	0.94 – 0.81	< 0.0001	2.4	0.11	
T	0.1 – 0.19			0.06 – 0.19	< 0.0001			
C6856T								
C	0.67 – 0.76	1.09	0.29	0.63 – 0.63	< 0.0001	0.001	0.97	
T	0.33 – 0.24			0.37 – 0.37	< 0.0001			
C6862T								
C	0.7 – 0.76	1.48	0.48	0.6842 – 0.7272	< 0.0001	0.12	0.72	
T	0.3 – 0.24			0.3158 – 0.2727	< 0.0001			

Tabela 16. Análise de associação entre combinações de alelos dos polimorfismos virais encontrados no gene L1 do HPV16 e a susceptibilidade para as lesões cervicais. Em negrito: conjunto de alelos significativos.

Polimorfismos virais	Frequências dos casos e controles	Qui Quadrado (χ^2)	Valor de <i>P</i>	Odds Ratio (OR)
A6697C A6805T				
AA	0.7-0.76	0.47	0.49	1
CA	0.2-0.04	4.84	0.02	4.57
CT	0.1-0.19	1.70	0.19	0.57
G6723A A6805T				
GA	0.63-0.76	1.89	0.16	1
AA	0.26-0.04	8.15	0.004	6.73
AT	0.1-0.19	1.70	0.19	0.63
A6805T C6862T				
AC	0.7-0.76	0.47	0.49	1
TC	0.2-0.04	4.84	0.02	4.57
TT	0.1-0.19	1.70	0.19	0.57
A6697C G6723A A6805T				

AGA	0.63-0.76	1.89	0.16	1
AAA	0.06-0.0	2.91	0.08	4.8e+008
CAA	0.2-0.04	4.94	0.02	5.05
CAT	0.1-0.19	1.70	0.19	0.63
A6697C A6805T C6862T				
AAC	0.7-0.76	0.47	0.49	1
CAT	0.2-0.04	4.84	0.02	4.57
CTT	0.1-0.19	1.70	0.19	0.57
G6723A A6805T C6856T				
GAC	0.63-0.71	0.72	0.39	1
GAT	0.0-0.04	2.91	0.08	0
AAT	0.26-0.04	8.15	0.004	6.31
ATC	0.03-0.04	0.13	0.71	0.78
ATT	0.06-0.14	1.62	0.20	0.52
G6723A A6805T C6862T				
GAC	0.63-0.76	1.89	0.16	1
AAC	0.06-0.0	2.91	0.08	4.87e+008

AAT	0.2-0.04	4.84	0.02	5.05
ATT	0.1-0.19	1.70	0.19	0.63
A6697C				
G6723A				
A6805T				
C6856T				
AGAC	0.63-0.71	0.72	0.39	1
AGAT	0.0-0.04	2.9	0.08	1.55e-008
AAAT	0.06-0.0	2.91	0.08	2.43e+246
CAAT	0.2-0.04	4.84	0.02	4.73
CATC	0.03-0.04	0.13	0.71	0.78
CATT	0.06-0.14	1.62	0.20	0.52
A6697C				
G6723A				
A6805T				
C6862T				
AGAC	0.63-0.76	1.89	0.16	1
AAAC	0.06-0.0	2.91	0.08	4.87e+008
CAAT	0.2-0.04	4.84	0.02	5.05
CATT	0.1-0.19	1.70	0.19	0.63
G6723A				
A6805T				
C6856T				
C6862T				

GACC	0.63-0.71	0.72	0.39	1
GATC	0.0-0.04	2.91	0.08	1.55e-008
AATC	0.06-0.0	2.91	0.08	2.43+246
AATT	0.2-0.04	4.84	0.02	4.73
ATCT	0.03-0.04	0.13	0.71	0.78
ATTT	0.06-0.14	1.62	0.20	0.52
A6697C				
G6723A				
A6805T				
C6856T				
C6862T				
AGACC	0.63-0.71	0.72	0.39	1
AGATC	0.0-0.04	2.91	0.08	1.55e-008
AAATC	0.06-0.0	2.91	0.08	2.43e+246
CAATT	0.2-0.04	4.84	0.02	4.73
CATCT	0.03-0.04	0.13	0.71	0.78
CATTT	0.06-0.14	1.62	0.20	0.52

6. DISCUSSÃO

6.1 Principais tipos de HPVs encontrados no Nordeste Brasileiro

Infecções persistentes causadas por HR HPVs estão relacionadas com cânceres em diversos sítios corporais em humanos, tais como na cérvix, orofaringe, pênis, ânus, vagina e vulva (JEMAL et al., 2013). Recentes estudos têm mostrado uma diminuição na incidência dos casos e mortes causadas pelo câncer cervical (JEMAL et al., 2013; VACCARELLA et al., 2013). Contudo, os casos de cânceres não cervicais associados a uma infecção persistente causada por HR HPVs tem aumentado, especialmente nos casos de câncer da orofaringe e do ânus (JEMAL et al., 2013). Embora existam 19 HR HPVs, os HR HPVs 16 e 18 são os genótipos encontrados em mais de 70% dos casos de câncer cervical (DE SANJOSE et al., 2010). Do mesmo modo, o HPV16 é o genótipo mais encontrado em cânceres não cervicais associados aos HPVs, sendo encontrado em mais de 90% dos casos (JEMAL et al., 2013).

Apesar da diminuição nos óbitos causados por câncer cervical, dados epidemiológicos mostram que mais de 265,000 mulheres morrem todos os anos vítimas desta doença. Neste sentido, somente os HPV16 e HPV18 estão envolvidos em 70% dos casos de câncer de células escamosas e em 50,9% nos casos de adenocarcinomas (DE SANJOSE et al., 2010; PIROG et al., 2014). Entretanto, a prevalência dos demais genótipos dos HPVs diferem entre países e até mesmo entre regiões geográficas de um mesmo país. Neste sentido, a distribuição dos genótipos dos HPVs no Brasil parece ser bastante complexa, tendo em vista os estudos que mostram divergências na prevalência dos principais tipos de HPVs. Apesar disso, todos os estudos relativos a prevalência dos HPVs mostram que o genótipo 16 é o mais prevalente (ALENCAR et al., 2006; BALDEZ DA SILVA et al., 2009, 2012; CASTRO et al., 2011; CRUZ et al., 2004; FERNANDES et al., 2010, 2008a, 2008b; FREITAS et al., 2014; GURGEL et al.,

2013b; VERÍSSIMO FERNANDES et al., 2011). De fato, a prevalência dos demais genótipos diverge nestes estudos. Por exemplo, na região Centro-Oeste do Brasil, foi observado uma prevalência dos genótipos 16, 33, 18 e 31 (RABELO-SANTOS et al., 2003). No Sudeste do Brasil, dois estudos mostraram padrões diferentes de distribuição dos HPVs, sendo observada a prevalência dos HPVs 16, 18, 45 e 58 para o Estado do Rio de Janeiro (PITTA et al., 2010) e dos HPVs 16, 31, 45 e 18 para o Estado de São Paulo. Na região Norte do Brasil, um estudo mostrou que os principais tipos de HPVs são 16, 33, 58, 66 e 68 na região da amazônia (CASTRO et al., 2011). No Nordeste do Brasil, dois estudos realizados com a população do estado do Rio Grande do Norte mostraram diferenças na distribuição dos HPVs mais frequentes. Um destes estudos mostrou que o HPV58 é o segundo tipo mais prevalente (FERNANDES et al., 2008a), enquanto no outro estudo, o HPV18 foi o mais prevalente (FERNANDES et al., 2010). No estado de Pernambuco, um estudo desenvolvido por Baldez da Silva e colaboradores mostrou que os HPVs 16, 31, 33 e 18 são os mais frequentes nesta população nordestina (BALDEZ DA SILVA et al., 2009). O presente estudo detectou o DNA dos HPVs em amostras citológicas oriundas de pacientes da região metropolitana de três estados brasileiros: Recife, Estado de Pernambuco; Maceió, Estado de Alagoas e; Aracaju, Estado do Sergipe. No presente estudo, foram detectados vinte e três tipos de HPVs (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 53, 54, 56, 58, 61, 62, 66, 70, 72, 81, 82, 83 e 84). Os HPVs mais prevalentes foram os genótipos 16, 31 e 58. O resultado do presente estudo corrobora com os obtidos por Baldez da Silva e colaboradores, embora o terceiro tipo mais frequente tenha sido diferente nos dois estudos (BALDEZ DA SILVA et al., 2009). Os resultados conflitantes dos diferentes estudos de prevalência de HPV acima mencionados podem ser atribuídos às diferentes estratégias de detecção do HPV adotadas. A estratégia PCR/sequenciamento do fragmento de MY09/11 permite a

detecção de diversos tipos de HPVs, porém apresenta a desvantagem de não detectar múltiplas infecções, subestimando a prevalência de outros genótipos virais. A estratégia PCR tipo-específico utiliza primers que permitem a amplificação de apenas um tipo viral, permitindo a amplificação em amostras coinfectadas com outros HPVs. Contudo, este método apresenta a desvantagem de não conseguir detectar uma ampla variedade de genótipos virais. O presente estudo utilizou a estratégia de PCR/sequenciamento e PCR tipo-específico, para confirmar os resultados obtidos das PCRs e para detectar as possíveis coinfeções.

O conhecimento sobre os tipos mais prevalentes de HPVs de uma região geográfica é importante face às estratégias de vacinação contra os HPVs. No Brasil, existem atualmente duas vacinas licenciadas contra os HPVs: a vacina bivalente (protege contra os HPVs 16 e 18) e a vacina tetravalente (protege contra os HPVs 6, 11, 16 e 18). Diversas evidências têm mostrado uma proteção cruzada da vacina bivalente contra os HPVs 31, 33 e 45 (CÓMBITA et al., 2013; GOLDSTONE et al., 2013; HILDESHEIM et al., 2014; KAHN et al., 2012; KAVANAGH et al., 2014; LEHTINEN et al., 2012; MALAGÓN et al., 2012; TABRIZI et al., 2014; WHEELER et al., 2012). Apesar da proteção cruzada, existe a necessidade de novas estratégias vacinais para a população nordestina do Brasil face aos resultados dos estudos de prevalência realizados com populações desta região, incluindo o presente estudo. Neste sentido, a vacina Nonavalente HPV V503 (Merck Sharp and Dohme) acaba de ser aprovada pela FDA e pretende prevenir cerca de 97% dos casos de câncer cervical, vaginal e vulvar. Com base nos dados de prevalência obtidos no presente estudo e os dados de outros estudos realizados em diferentes regiões do Brasil (ALENCAR et al., 2006; BALDEZ DA SILVA et al., 2009, 2012; CASTRO et al., 2011; CRUZ et al., 2004; FERNANDES et al., 2010, 2008a, 2008b; FREITAS et al., 2014; GURGEL et al., 2013b; VERÍSSIMO

FERNANDES et al., 2011), a vacina nonavalente poderá imunizar grande parte da população brasileira, uma vez que esta vacina cobre os genótipos HPV6/11/16/18/31/33/45/52/58. Entretanto, vale ressaltar que a vacina nonavalente não cobre outros tipos de HPVs oncogênicos, como exemplo o HPV56.

6.2 Estudo de variabilidade genética

Diversos estudos tem demonstrado que variantes dos HPVs 16, 31 e 58 podem afetar a oncogenicidade, persistencia e progressão da infecção viral (BERUMEN et al., 2001; BURK et al., 2003; BURRONI et al., 2013; CHANG et al., 2011; CHANSAENROJ et al., 2012; CORNET et al., 2013; GHEIT et al., 2011; HO et al., 2005; LONDESBOROUGH et al., 1996; QUINT et al., 2010; SCHIFFMAN et al., 2010; SICHERO et al., 2007; VILLA et al., 2000; XI et al., 2007; YAMADA et al., 1997; ZEHBE et al., 2011; ZUNA et al., 2011). Assim, o estudo molecular de variantes de HPVs circulantes de uma região geográfica pode ser uma importante ferramenta epidemiológica, tendo em vista o risco de persistência da infecção viral e a susceptibilidade para o desenvolvimento de lesões cervicais (SICHERO et al., 2007; SICHERO; VILLA, 2006; VILLA et al., 2000). Apesar da importância, existem poucos estudos de variabilidade genética dos HPVs circulantes no Nordeste do Brasil (CHAGAS et al., 2013, 2013; DE FREITAS et al., 2012; GURGEL et al., 2013). Para tanto, o presente estudo avaliou a diversidade genética do gene L1 dos HPVs 16, 31, 53, 54, 56, 56, 58, 61, 62, 66, 70 e 81 detectados em pacientes oriundas de três cidades do Nordeste do Brasil. Além disso, o presente trabalho também analisou a variabilidade genética da LCR dos três genótipos mais comuns encontrados nas amostras estudadas, nomeadamente HPV16, 31 e 58. Os resultados deste estudo mostraram uma grande diversidade genética dos HPVs circulantes no Nordeste do Brasil. No total, foram

detectadas 193 alterações nucleotídicas, incluindo 10 novas variações descritas pela primeira vez na literatura.

6.2.1 Estudo de variabilidade genética do gene L1

Apesar de terem sido detectadas oito novas variações no gene L1 do total de HPV's estudados, a grande maioria das alterações sinônimas e não sinônimas do gene L1 foi observada também em outros estudos (CENTO et al., 2009; DE BOER et al., 2004; FRATI et al., 2011; LIU et al., 2012; NTOVA et al., 2011; PILLAI et al., 2009; RAIOL et al., 2009; SHANG et al., 2011; SUN et al., 2011; WHEELER et al., 1997; YUE et al., 2013). Alterações nucleotídicas no gene L1 parecem ter um importante papel na estrutura do capsídeo viral, no reconhecimento imunológico e na neutralização viral (BISHOP et al., 2007; FAUST; DILLNER, 2013; FLEURY et al., 2009; PANDE et al., 2008). Por exemplo, foi demonstrado que alterações nos resíduos 83-97 da proteína L1 tem um importante impacto no rendimento da proteína L1 quando expressado em sistemas heterólogos (TOUZE et al., 1998). Além disso, variações na região da 4^o hélice podem produzir pentâmeros incapazes de se automontar em VLPs (CHEN et al., 2000). Neste sentido, as inserções dos aminoácidos treonina e serina, na posição 448, e a deleção do ácido aspartico, na posição 465, observadas em todas as amostras do presente estudo, estão localizadas na região da 4^o hélice da proteína L1 do HPV16 e podem ter um impacto na formação de VLPs. Ademais, em um estudo prévio, foi demonstrado que a alteração nucleotídica C6240G, que leva a uma alteração na sequência de aminoácidos H202D, presente também em cinco amostras neste estudo, apresenta uma automontagem em VLPs mais eficiente quando comparado com o seu protótipo (KIRNBAUER et al., 1993).

Alterações de aminoácidos também podem levar a mudanças nas alças externas da proteína L1, elicitando diferentes anticorpos ou inibindo a ligação com anticorpos monoclonais (BISHOP et al., 2007). Inserções, deleções ou substituições de aminoácidos nas regiões das alças externas da proteína L1 podem alterar a conformação espacial da proteína L1, sendo necessário uma mudança de apenas 1 Å ou 2Å para alterar a ligação dos anticorpos monoclonais específicos (BISHOP et al., 2007). No presente estudo, não foram observadas inserções e deleções nas regiões das alças externas da proteína L1 dos HPV's 31 e 58. Entretanto, foram observadas deleções e inserções na proteína L1 do HPV16. Além disso, foram observadas substituições de aminoácidos nas alças externas EF, FG e HI da proteína L1 dos HPV's 16, 31, 58 e 62. É sabido que as vacinas profiláticas atualmente disponíveis no mercado contra o HPV são baseadas em VLPs, que induzem anticorpos neutralizantes específicos contra um pequeno número de resíduos de aminoácidos, localizados nas alças externas da proteína L1 (FAUST; DILLNER, 2013). Neste sentido, estudos *in vivo* tem demonstrado que a imunização de camundogons com capsídeo da proteína L1 “mutado” diminui a resposta imunológica e a incorporação da proteína L2 no capsídeo (FAUST; DILLNER, 2013). Além disso, variações nas alças externas da proteína L1 parecem inibir a neutralização cruzada dos anticorpos e a encapsidação do genoma viral (FAUST; DILLNER, 2013). No presente estudo, foram observadas a variação A6436G (T292A), encontrada em variantes do HPV16, as variações A6025G (T267A), C6379A (T274N) encontradas em variantes do HPV31 e as variações A6025G (T267A), C6379A (T274N) encontradas em variantes do HPV58, sendo todas estas alterações de aminoácidos localizadas na região FG da proteína L1. Além disso, a variação A6697C (T379P) da proteína L1 do HPV16, a variação C6689A (T375N) da proteína L1 do HPV58, e as variações A6827C (A351T), A6838C (E354D) estão localizadas na região da alça HI. As alças externas

FG e HI são regiões de epitopos imunodominantes da proteína L1 do HPV16 e 31 (CHRISTENSEN et al., 2001; FLEURY et al., 2009). Sabendo-se que as vacinas bivalente e tetravalente contra o HPV conferem proteção através da elicitação de anticorpos contra alguns resíduos de aminoácidos das alças externas da proteína L1 e que VLPs “mutados” diminuem a resposta imunológica em camundogos, tornam-se necessários estudos sobre eficácia das atuais vacinas contra as variantes de HPVs circulantes no Nordeste do Brasil.

6.3 Variabilidade da LCR

Através da análise da sequência dos LCRs estudados, foi possível observar que a LCR do HPV58 apresentou uma maior variabilidade genética (5,08%) quando comparadas com o HPV16 (3,95%) e HPV31 (3,83%). Além disso, duas novas variações, uma na LCR do HPV31 e a outra no HPV58, foram identificadas. A variação T190A descrita pela primeira vez, está inserida em um sítio de ação do fator transcricional C/EBP beta. A deleção de TATACAT na sequência da LCR, observada no HPV58 não está inserida em sítios de ligação dos fatores transcricionais pesquisados.

No presente estudo, foram efetuadas análises *in silico* de possíveis sítios de ligação de fatores transcricionais inseridos em regiões de alteração nucleotídica na LCR. Para tal, foram analisados sítios de ligação para fatores transcricionais que ativam (AP1, Oct1, NF1 e SP1) e que inibem (E2, YY1, C/EBPbeta) a expressão dos oncogenes virais. Variações nucleotídicas na LCR podem alterar a afinidade dos fatores transcricionais celular e viral. Por exemplo, alterações nucleotídicas podem resultar na perda ou ganho de um fator transcricional que regula a expressão dos oncogenes dos HR HPVs (SICHERO; SOBRINHO; VILLA, 2012). Dessa forma, mudanças na LCR das

variantes dos HPVs 16, 31 e 58 poderia explicar o potencial carcinogênico de algumas variantes dos HR HPVs (SICHERO; SOBRINHO; VILLA, 2012). A composição dos sítios de ligação dos fatores transcricionais celular e viral foi predita com o uso do programa PROMO. A análise de variabilidade das LCRs dos HPVs 16, 31 e 58 mostrou uma grande diversidade genética desta região, com variações nucleotídicas inseridas em possíveis sítios de ligação de fatores transcricionais. A localização destas variações nas regiões sobrepostas fatores transcricionais podem alterar a expressão dos oncogenes E6 e E7, através da supressão da capacidade de ligação dos fatores transcricionais ou pela redução da afinidade com o sítio de ligação.

Com relação ao HPV16, 26,6% das alterações genéticas observadas na LCR estavam inseridas em sítios de ligação para C/EBP beta. Em relação ao HPV31, foram observados que um total de 10,33% das variações encontradas estavam situadas em sítios para C/EBP beta, enquanto no HPV58, o percentual foi de 8,57%. Estudos mostram que o fator transcricional C/EBPbeta atua reprimindo a expressão dos oncogenes virais, vez que compete com a proteína de iniciação de transcrição TBP pelo sítio TATA-box na LCR (BAUKNECHT; et al., 1996). Além disso, um estudo funcional com o HPV31 mostrou que sítios polimórficos sobrepostos ao fator transcricional C/EBP beta diminuí a atividade do promotor viral p99 (SEN et al., 2002). Dessa forma, as variações detectadas no presente estudo podem diminuir a ligação do C/EBP beta com seu sítio, permitindo a expressão de oncogenes virais. Um outro fator que atua na repressão da atividade transcricional é o YY1. No presente trabalho, foi observado que 26,6% das variações observadas na LCR do HPV16 estavam sobrepostos no sítio de ligação do fator YY1. Por sua vez, foram observados que um total de 10,33% das variações encontradas estavam situadas em sítios para YY1 na LCR do HPV31, enquanto no HPV58, este percentual foi de 8,57%. Estudos tem demonstrado que o fator

transcricional YY1 bem como o complexo formado por C/EBP beta /YY1 conferem uma repressão da atividade dos promotores dos HPVs (BAUKNECHT et al., 1996). A repressão mediada pelo fator transcricional YY1 ocorre devido ao complexo formado YY1/E2 que se liga na região ori, no segmento 3´da LCR dos HPVs (LEE et al., 1998). Um total de 6,6% dos sítios polimórficos detectados na LCR do HPV16 estavam situados na região de ligação do fator transcricional E2. Ademais, esse percentual foi de 10% para a LCR do HPV31 e de 5,71% para o HPV58. Estudos têm demonstrado que mutações na LCR do HPV16 estão associadas com o casos de câncer cervical, quando comparada com grupos controles (BHATTACHARJEE; SENGUPTA, 2006). Assim, estudos funcionais com as variações descritas no presente trabalho devem ser feita, a fim de esclarecer o papel destas alterações nucleotídicas em sítios de ligação de fatores transcricionais repressores nas LCRs dos HPV analisados.

Curiosamente, não foi detectado nenhum sítio polimórfico inserido no fator transcricional SP1. Além disso, também não foi observado nenhuma variação genética na LCR do HPV31 na região de ligação do fator transcricional Oct-1, embora tenha sido observado um percentual de 6,6% de variação dentro da região de ligação do fator Oct-1 na LCR do HPV16 e 5,71% na LCR do HPV58. Com relação ao fator transcricional AP-1, foram detectados sítios polimórficos em 3% das variações da LCR do HPV16, 6,6 na LCR do HPV31 e 5,7% na LCR do HPV58. Entretanto, o percentual de sítios polimórficos para a região de ligação do NF-1 foi de 13,3% para a LCR HPV16 e 31 e de 5,7% para a LCR do HPV58. Os fatores transcricionais SP1, Oct-1, AP1 e NF-1 são ativadores da expressão dos oncogenes E6 e E7 (O'CONNOR; BERNARD, 1995). Assim, estudos funcionais com as variações detectadas em sítios de ligação dos fatores transcricionais de ativação dos promotores virais devem ser realizados, a fim de se esclarecer a repercussão destas variações na transcrição dos oncogenes E6 e E7.

6.4 Análise filogenética

Foi também realizado uma análise filogenética usando os fragmentos da LCR. Os resultados mostraram o percentual de 63,63% dos isolados pertencentes a variante A, enquanto 33,36% dos isolados pertencentes a variante D. Estes resultados são semelhantes aos encontrados no Centro-Oeste do Brasil (CRUZ et al., 2004), que mostrou uma alta prevalência da variante A e D e baixa frequência das variantes B e C. Entretanto, um estudo recente desenvolvido no sudeste do Brasil mostrou que as variantes A e C são as mais prevalentes, seguidas pelas variantes D e B (FREITAS et al., 2014). Um estudo prévio, utilizando 27 países e usando 953 amostras de câncer cervical, mostrou que a variante A é a mais prevalente, seguidas pelas variantes C, B e D (CORNET et al., 2012). Estas diferenças na prevalência das variantes do HPV16 em diferentes regiões do Brasil pode ser explicada, em parte, pela mistura de etnias na população brasileira (FREITAS et al., 2014).

A região da LCR contém informações filogenéticas mais robustas quando comparadas com outras regiões do genoma viral e por isso pode ser distinguida em variantes e sublinhagens (CORNET et al., 2012). Devido a fixação da linhagem (variantes) e o suposto processo de não recombinação dos genomas de HPVs, alguns estudos tem proposto uma classificação baseada em variantes e sublinhagens com base em sítios polimorfismos apresentados na região da LCR (CORNET et al., 2012; SMITH et al., 2011). Cornet e colaboradores propuseram que as linhagens de HPV16 podem ser detectadas através de 32 combinações de polimorfismos encontrados na LCR do HPV16, chamado de SNPs de diagnóstico (CORNET et al., 2012). Neste sentido, alguns destes SNPs de diagnósticos estão presentes neste trabalho. Por exemplo, a variação T7747G encontrada em sete isolados deste estudo é um SNP de diagnóstico para a sublinhagem (sub variante) AA1. Além disso, G7891G foi encontrada em sete

isolados e é um SNP de diagnóstico para a sublinhagem AA2. Tanto as sublinhagens AA1 quanto AA2 pertencem a variante D, considerada a mais oncogênica (CORNET et al., 2012).

Com relação ao HPV31, as análises filogenéticas da LCR revelaram a presença das variantes A e C no Nordeste do Brasil. Estes resultados são similares aos encontrados por Chagas et al., que reportaram a presença da variante A and C e a baixa frequência da variante B no Nordeste do Brasil (CHAGAS et al., 2011, 2013). As variantes A e B são mais oncogênicas quando comparadas com a variante C (XI et al., 2012). Neste estudo, foi observado um percentual de 62,5% da variante oncogênica do HPV31 circulante no Nordeste do Brasil. Contudo, mais estudos devem ser realizados, com um maior número de amostras, com a finalidade de esclarecer se existe uma predominância da variante oncogênica na população estudada.

Análises filogenéticas também foram realizadas com o HPV58 e os resultados mostraram a presença das variantes A, B, C e D no Nordeste do Brasil. Neste estudo, a variante A foi a mais prevalente (50%), seguidas pelas variantes B (16,6%), C (16,6%) e D (16,6%) variantes. Dados obtidos de estudos mundiais mostram que a variante A é a mais prevalente, seguida pela C e D variantes (CHAN et al., 2011). Além disso, a variante A é mais oncogênica quando comparada com as variantes B, C e D. Estudos adicionais devem ser realizados para esclarecer se essas diferenças na prevalência de variantes HPV58 são devido ao pequeno número de isolados analisados ou se há diferenças significativas na prevalência das variantes A do HPV58 na região Nordeste do Brasil.

6.5 Análise de associação dos polimorfismos virais com o risco do desenvolvimento de lesões cervicais

Neste estudo, não foi observado uma associação entre polimorfismos no gene L1 e a susceptibilidade para as lesões cervicais. Contudo, foi observado que combinações de alelos do gene L1 do HPV16 são significativamente mais frequentes em pacientes com lesões cervicais quando comparadas com pacientes saudáveis e portadoras do HPV16. Além disso, as variantes do HPV16 têm um risco superior a 4,5 vezes de desenvolver lesões cervicais quando comparadas com o grupo controle. Este é o primeiro estudo que demonstra uma associação entre a combinação de alelos de polimorfismos virais do gene L1 do HPV16 e um alto risco de desenvolver lesões cervicais. A combinação de alelos associada com os casos de lesões cervicais podem ser decorrente de dois processos: existência de haplótipos nas populações de HPV ou uma presença de uma variante específica. A primeira hipótese parece ser a menos plausível, tendo em vista que os genomas de PVs normalmente não se recombinam (CORNET et al., 2012; SMITH et al., 2011). Uma variante específica, provavelmente a variante D do HPV16, deve apresentar a combinação de alelos observada. Para tanto, o sequenciamento completo dos genes L1, E6 e da LCR devem ser realizados, para confirmar a presença de uma variante oncogênica circulante no Nordeste do Brasil.

Vários estudos têm sido realizados entre as variantes A, B, C e D do HPV16 (também chamadas de variações européias e não européias) e a oncogenicidade, persistência da infecção e progressão das lesões cervicais (BURRONI et al., 2013; HO et al., 2005; KÄMMER et al., 2002b; LONDESBOROUGH et al., 1996; SCHIFFMAN et al., 2010; SICHERO et al., 2007; SICHERO; VILLA, 2006; XI et al., 1997, 2007; YAMADA et al., 1997; ZEHBE et al., 2011). Embora uma grande parte desses estudos analisem os oncogenes E6 e E7 de HPV16, os resultados deste estudo, com base no

gene L1, corroboram para uma associação entre variantes B, C ou D do HPV16 e o risco de desenvolver lesão. Assim, nós hipotetizamos que as variantes B, C ou D do HPV16 pode ter, além de uma susceptibilidade para oncogenicidade, também uma maior infectividade em células hospedeiras. As alterações nas sequências de aminoácidos de proteína L1 em epitopos de células B e células T pode afetar a resposta imunitária específica para as variantes, podendo ter um impacto na infeciosidade em células hospedeiras. Neste sentido, Dasgupta e colaboradores mostraram que variações no gene L1 do HPV16 têm uma infectiosidade alterada significativamente quando comparado com o protótipo (Dasgupta et al., 2011). Assim, estudos funcionais com estas variantes de L1 devem ser realizados para esclarecer se as variantes encontradas no Nordeste Brasil tem um impacto na infectividade.

7. CONCLUSÕES

- 1- Foram detectados 23 tipos de HPVs circulantes na população nordestina estudada: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 53, 54, 56, 58, 61, 62, 66, 70, 72, 81, 82, 83 e 84;
- 2- Os três tipos de HPVs mais incidentes na população nordestina estudada foram os HPVs 16, 31 e 58;
- 3- Foram detectadas 98 mutações nos genes L1 dos HPVs analisados. Além disso, foram detectadas 95 mutações nas LCR dos HPVs 16, 31 e 58;
- 4- Foram detectadas 10 novas alterações nucleotídicas, sendo 8 nos genes L1, 1 na LCR do HPV31 e 1 na LCR do HPV58;
- 5- Com relação ao gene L1, foram observados percentuais de 18,36%, 25,5% e 18,36% das variações nucleotídicas não-sinônimas situadas em regiões de epítopos de células B, MHC Classe I e Classe II, respectivamente;
- 6- Com relação a LCR, um total de 51,57% das mutações detectadas estão situadas em sítios de ligação dos fatores transcricionais viral e celular;
- 7- As análises filogenéticas mostraram a presença das variantes A e D do HPV16, A e C do HPV31 e A, B, C e D do HPV58 circulante no Nordeste do Brasil;
- 8- Não foram observadas associações significativas ($p>0.05$) entre os polimorfismos virais do gene L1 e o risco para desenvolver lesões cervicais na população estudada;
- 9- Contudo, combinação de determinados alelos destes polimorfismos virais está fortemente associada ($p<0.05$) com o risco de desenvolver lesão cervical na população estudada.

8. Bibliografia

AGUAYO, F. et al. Human papillomavirus-16 is integrated in lung carcinomas: a study in Chile. **British journal of cancer**, v. 97, n. 1, p. 85–91, 2 jul. 2007.

ALBANELL, J. et al. High Telomerase Activity in Primary Lung Cancers: Association With Increased Cell Proliferation Rates and Advanced Pathologic Stage. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, n. 21, p. 1609–1615, 5 nov. 1997.

ALENCAR, T. R. et al. New HPV-16 European and non-European variants in Central Brazil. **Virus Genes**, v. 35, p. 1–4, 18 out. 2006.

ALTEKRUSE, S. F. et al. Comparison of human papillomavirus genotypes, sexual, and reproductive risk factors of cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma: Northeastern United States. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 188, n. 3, p. 657–663, mar. 2003.

AMARAL, C. M. et al. MDM2 polymorphism associated with the development of cervical lesions in women infected with Human papillomavirus and using of oral contraceptives. **Infectious Agents and Cancer**, v. 9, n. 1, p. 24, 18 jul. 2014.

ARIAS-PULIDO, H. et al. Human papillomavirus type 18 variant lineages in United States populations characterized by sequence analysis of LCR-E6, E2, and L1 regions. **Virology**, v. 338, n. 1, p. 22–34, 20 jul. 2005.

AU, W. W. Life style, environmental and genetic susceptibility to cervical cancer. **Toxicology**, v. 198, n. 1-3, p. 117–120, 20 maio 2004.

BALDEZ DA SILVA, M. F. P. T. et al. HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. **Genetics and Molecular Research: GMR**, v. 8, n. 4, p. 1437–1443, 2009.

BALDEZ DA SILVA, M. F. P. T. et al. Frequency of human papillomavirus types 16, 18, 31, and 33 and sites of cervical lesions in gynecological patients from Recife, Brazil. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 11, n. 1, p. 462–466, 2012.

BAUKNECHT, T.; SEE, R. H.; SHI, Y. A novel C/EBP beta-YY1 complex controls the cell-type-specific activity of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region. **Journal of Virology**, v. 70, n. 11, p. 7695–7705, nov. 1996.

BERGVALL, M.; MELENDY, T.; ARCHAMBAULT, J. The E1 proteins. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 35–56, out. 2013.

BERNARD, H.-U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70–79, 25 maio 2010.

BERNARD, H.-U. Regulatory elements in the viral genome. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 197–204, out. 2013.

BERUMEN, J. et al. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, n. 17, p. 1325–1330, 5 set. 2001.

BESKOW, A. H. et al. Interaction of host and viral risk factors for development of cervical carcinoma in situ. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 117, n. 4, p. 690–692, 20 nov. 2005.

BHATTACHARJEE, B.; SENGUPTA, S. HPV16 E2 gene disruption and polymorphisms of E2 and LCR: Some significant associations with cervical cancer in Indian women. **Gynecologic Oncology**, v. 100, n. 2, p. 372–378, Fevereiro 2006.

BHATTACHARYA, P.; SENGUPTA, S. Lack of evidence that proline homozygosity at codon 72 of p53 and rare arginine allele at codon 31 of p21, jointly mediate cervical cancer susceptibility among Indian women. **Gynecologic Oncology**, v. 99, n. 1, p. 176–182, out. 2005.

BISHOP, B.; DASGUPTA, J.; CHEN, X. S. Structure-based engineering of papillomavirus major capsid L1: controlling particle assembly. **Virology Journal**, v. 4, n. 1, p. 3, 8 jan. 2007.

BRAVO, I. G.; FÉLEZ-SÁNCHEZ, M. Papillomaviruses: viral evolution, cancer and evolutionary medicine. **Evolution, Medicine, and Public Health**, 28 jan. 2015.

BROSO, P. R.; BUFFETTI, G. [The Papanicolaou classification in the Bethesda system (National Cancer Institute, Bethesda, Maryland)]. **Minerva Ginecologica**, v. 45, n. 11, p. 557–563, nov. 1993.

BUCK, C. B.; DAY, P. M.; TRUS, B. L. The papillomavirus major capsid protein L1. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 169–174, out. 2013.

BURK, R. D. et al. Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. **Cancer research**, v. 63, n. 21, p. 7215–7220, 1 nov. 2003.

BURK, R. D.; HARARI, A.; CHEN, Z. Human papillomavirus genome variants. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 232–243, out. 2013.

BURRONI, E. et al. Codon 72 polymorphism of p53 and HPV type 16 E6 variants as risk factors for patients with squamous epithelial lesion of the uterine cervix. **Journal of medical virology**, v. 85, n. 1, p. 83–90, jan. 2013.

CARPAGNANO, G. E. et al. HPV in exhaled breath condensate of lung cancer patients. **British journal of cancer**, v. 105, n. 8, p. 1183–1190, 11 out. 2011.

CASTRO, M. M. et al. Prevalence of human papillomavirus (HPV) type 16 variants and rare HPV types in the central Amazon region. **Genetics and Molecular Research: GMR**, v. 10, n. 1, p. 186–196, 2011.

- CENTO, V. et al. Genetic diversity of human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 genes in Italian women with different grades of cervical lesions. **Journal of Medical Virology**, v. 81, n. 9, p. 1627–1634, 2009.
- CENTO, V. et al. Intratype variations of HPV 31 and 58 in Italian women with abnormal cervical cytology. **Journal of Medical Virology**, v. 83, n. 10, p. 1752–1761, out. 2011.
- CENTO, V. et al. Human papillomaviruses 53 and 66: clinical aspects and genetic analysis. **Virus research**, v. 163, n. 1, p. 212–222, jan. 2012.
- CERQUEIRA, D. M. et al. Variants of human papillomavirus types 53, 58 and 66 identified in Central Brazil. **Virus Genes**, v. 26, n. 1, p. 83–87, 2003.
- CERQUEIRA, D. M. et al. New variants of human papillomavirus type 18 identified in central Brazil. **Virus Genes**, v. 37, n. 2, p. 282–287, 2008.
- CHAGAS, B. S. et al. New variants of E6 and E7 oncogenes of human papillomavirus type 31 identified in Northeastern Brazil. **Gynecologic Oncology**, v. 123, n. 2, p. 284–288, nov. 2011.
- CHAGAS, B. S. et al. Novel E6 and E7 oncogenes variants of human papillomavirus type 31 in Brazilian women with abnormal cervical cytology. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 16, p. 13–18, jun. 2013.
- CHANG, Y.-J. et al. Unique variants of human papillomavirus genotypes 52 and 58 and risk of cervical neoplasia. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 129, n. 4, p. 965–973, 15 ago. 2011.
- CHAN, P. K. S. et al. Association of Human Papillomavirus Type 58 Variant With the Risk of Cervical Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 16, p. 1249–1253, 2002.
- CHANSAENROJ, J. et al. Whole genome analysis of human papillomavirus type 16 multiple infection in cervical cancer patients. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 13, n. 2, p. 599–606, 2012.
- CHEN, X. S. et al. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. **Molecular cell**, v. 5, n. 3, p. 557–567, mar. 2000.
- 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, n. 5, p. e20183, 2011.
- CHRISTENSEN, N. D. et al. Hybrid papillomavirus L1 molecules assemble into virus-like particles that reconstitute conformational epitopes and induce neutralizing antibodies to distinct HPV types. **Virology**, v. 291, n. 2, p. 324–334, 20 dez. 2001.
- CÓMBITA, A. et al. Evaluation of the immune response to human papillomavirus types 16, 18, 31, 45 and 58 in a group of Colombian women vaccinated with the quadrivalent vaccine. **Revista Colombiana de Cancerología**, v. 17, n. 3, p. 103–110, set. 2013.

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. 183–188, 16 out. 2001.

CORNET, I. et al. Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR. **Journal of virology**, v. 86, n. 12, p. 6855–6861, jun. 2012.

CORNET, I. et al. Human papillomavirus type 16 E6 variants in France and risk of viral persistence. **Infectious Agents and Cancer**, v. 8, n. 1, p. 4, 23 jan. 2013.

CORNUT, G. et al. Polymorphism of the capsid L1 gene of human papillomavirus types 31, 33, and 35. **Journal of Medical Virology**, v. 82, p. 1168–1178, jul. 2010.

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. 281–282, maio 2004.

CUBIE, H. A. Diseases associated with human papillomavirus infection. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 21–34, out. 2013.

DE BOER, M. A. et al. Human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and The Netherlands. **Gynecologic Oncology**, v. 94, n. 2, p. 488–494, ago. 2004.

DE FREITAS, A. C. et al. Susceptibility to cervical cancer: An overview. **Gynecologic Oncology**, 4 abr. 2012.

DE LA CRUZ-HERNÁNDEZ, E. et al. Differential splicing of E6 within human papillomavirus type 18 variants and functional consequences. **Journal of General Virology**, v. 86, n. 9, p. 2459–2468, 2005.

DE SANJOSE, S. et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. **The Lancet Oncology**, v. 11, n. 11, p. 1048–1056, nov. 2010.

DE VILLIERS, E.-M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17–27, 20 jun. 2004.

DIMAIO, D.; PETTI, L. M. The E5 proteins. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 99–114, out. 2013.

DING, T. et al. Distribution of human papillomavirus 58 and 52 E6/E7 variants in cervical neoplasia in Chinese women. **Gynecologic Oncology**, v. 119, n. 3, p. 436–443, dez. 2010.

DONG, X. P.; PFISTER, H. Overlapping YY1- and aberrant SP1-binding sites proximal to the early promoter of human papillomavirus type 16. **The Journal of General Virology**, v. 80 (Pt 8), p. 2097–2101, ago. 1999.

DOORBAR, J. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30 Suppl 5, p. F55–70, 20 nov. 2012.

DOORBAR, J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 80–98, out. 2013.

EFIRD, J. T. et al. The combined influence of oral contraceptives and human papillomavirus virus on cutaneous squamous cell carcinoma. **Clinical Medicine Insights. Oncology**, v. 5, p. 55–75, 2011.

ELLIS, J. R. et al. The association of an HPV16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. **Nature medicine**, v. 1, n. 5, p. 464–470, maio 1995.

ERIKSSON, A. et al. Human papillomavirus type 16 variant lineages characterized by nucleotide sequence analysis of the E5 coding segment and the E2 hinge region. **Journal of General Virology**, v. 80, n. 3, p. 595–600, 1 mar. 1999.

FARRE, D. et al. Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3651–3653, 1 jul. 2003.

FAUST, H.; DILLNER, J. Mutations in human papillomavirus type 16 L1 hypervariable surface-exposed loops affect L2 binding and DNA encapsidation. **The Journal of General Virology**, v. 94, n. Pt 8, p. 1841–1849, ago. 2013.

FERNANDES, J. V. et al. Prevalence of human papillomavirus in archival samples obtained from patients with cervical pre-malignant and malignant lesions from Northeast Brazil. **BMC Research Notes**, v. 3, n. 1, p. 96, 8 abr. 2010.

FERNANDES, T. A. A. DE M. et al. Human papillomavirus infection in women attended at a cervical cancer screening service in Natal, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 573–578, set. 2008a.

FERNANDES, T. A. A. DE M. et al. Human papillomavirus infection in women attended at a cervical cancer screening service in Natal, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 573–578, set. 2008b.

FLEURY, M. J. J. et al. Identification of neutralizing conformational epitopes on the human papillomavirus type 31 major capsid protein and functional implications. **Protein Science: A Publication of the Protein Society**, v. 18, n. 7, p. 1425–1438, jul. 2009.

FRATI, E. et al. Genetic variability in the major capsid L1 protein of human papillomavirus type 16 (HPV-16) and 18 (HPV-18). **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 11, n. 8, p. 2119–2124, dez. 2011.

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, 1 jul. 2014.

FREITAS, Antonio Carlos; **GURGEL, Ana Pavla Almeida Diniz**; CHAGAS, Bárbara Simas; BALBINO, Valdir Queiroz; BATISTA, Marcus Vinícius de Aragão. Genetic Diversity of Human and Animal papillomaviruses. In: Julian A. Cervantes

Amaya and Miguel M. Franco Jimenez. (Org.). Genetic Diversity: New Research. Nova Science Publishers, 1 ed. 2012, p.1.

GAGNON, S. et al. Polymorphism of the L1 capsid gene and persistence of human papillomavirus type 52 infection in women at high risk or infected by HIV. **Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)**, v. 44, n. 1, p. 61–65, 1 jan. 2007.

GHANEM, K. G. et al. The association of current hormonal contraceptive use with type-specific HPV detection. **Sexually Transmitted Infections**, v. 87, n. 5, p. 385–388, ago. 2011.

GHEIT, T. et al. Risks for persistence and progression by human papillomavirus type 16 variant lineages among a population-based sample of Danish women. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 20, n. 7, p. 1315–1321, jul. 2011.

GIROGLOU, T. et al. Human Papillomavirus Infection Requires Cell Surface Heparan Sulfate. **Journal of Virology**, v. 75, n. 3, p. 1565–1570, 1 fev. 2001.

GODÍNEZ, J. M. et al. Differential presence of Papillomavirus variants in cervical cancer: an analysis for HPV33, HPV45 and HPV58. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 13, p. 96–104, jan. 2013.

GOLDSTONE, S. E. et al. Quadrivalent HPV vaccine efficacy against disease related to vaccine and non-vaccine HPV types in males. **Vaccine**, v. 31, n. 37, p. 3849–3855, 20 ago. 2013.

GRAVITT, P. E. et al. Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 357–361, 1 jan. 2000.

GRODZKI, M. et al. Increased risk for cervical disease progression of French women infected with the human papillomavirus type 16 E6-350G variant. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 15, n. 4, p. 820–822, abr. 2006.

GURGEL, A. P. A. D. et al. Prevalence and genetic variability in capsid L1 gene of rare human papillomaviruses (HPV) found in cervical lesions of women from North-East Brazil. **BioMed research international**, v. 2013, p. 546354, 2013.

HARIMA, Y. et al. Polymorphism of the WAF1 gene is related to susceptibility to cervical cancer in Japanese women. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 7, n. 3, p. 261–264, mar. 2001.

HILDESHEIM, A. et al. Efficacy of the HPV-16/18 vaccine: Final according to protocol results from the blinded phase of the randomized Costa Rica HPV-16/18 vaccine trial. **Vaccine**, v. 32, n. 39, p. 5087–5097, 3 set. 2014.

HO, C.-M. et al. Detection and quantitation of human papillomavirus type 16, 18 and 52 DNA in the peripheral blood of cervical cancer patients. **Gynecologic Oncology**, v. 99, n. 3, p. 615–621, dez. 2005.

HO, L. et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. **Journal of Virology**, v. 67, n. 11, p. 6413–6423, nov. 1993.

HU, W. et al. A Single Nucleotide Polymorphism in the MDM2 Gene Disrupts the Oscillation of p53 and MDM2 Levels in Cells. **Cancer Research**, v. 67, n. 6, p. 2757 – 2765, 15 mar. 2007.

HU, X. et al. TP53, MDM2, NQO1, and Susceptibility to Cervical Cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 19, n. 3, p. 755 –761, 1 mar. 2010.

INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER et al. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. **Lancet**, v. 370, n. 9599, p. 1609–1621, 10 nov. 2007.

JEMAL, A. et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975–2009, Featuring the Burden and Trends in Human Papillomavirus (HPV)–Associated Cancers and HPV Vaccination Coverage Levels. **Journal of the National Cancer Institute**, p. djs491, 7 jan. 2013.

JIANG, P. et al. Role of p53 and p21 polymorphisms in the risk of cervical cancer among Chinese women. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica**, v. 42, n. 9, p. 671–676, set. 2010.

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. 2067–2074, mar. 2009.

KAHN, J. A. et al. Vaccine-Type Human Papillomavirus and Evidence of Herd Protection After Vaccine Introduction. **Pediatrics**, p. peds.2011–3587, 9 jul. 2012.

KÄMMER, C. et al. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 8, p. 1975–1981, 1 ago. 2000.

KÄMMER, C. et al. Variants of the long control region and the E6 oncogene in European human papillomavirus type 16 isolates: implications for cervical disease. **British Journal of Cancer**, v. 86, n. 2, p. 269–273, 21 jan. 2002a.

KÄMMER, C. et al. Variants of the long control region and the E6 oncogene in European human papillomavirus type 16 isolates: implications for cervical disease. **British Journal of Cancer**, v. 86, n. 2, p. 269–273, 21 jan. 2002b.

KAVANAGH, K. et al. Introduction and sustained high coverage of the HPV bivalent vaccine leads to a reduction in prevalence of HPV 16/18 and closely related HPV types. **British Journal of Cancer**, v. 110, n. 11, p. 2804–2811, 27 maio 2014.

KHOUDRI, S. et al. Human Papillomavirus Type 33 Polymorphisms and High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions of the Uterine Cervix. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. 7, p. 886–894, Outubro 2006.

KIRNBAUER, R. et al. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. **J. Virol.**, v. 67, n. 12, p. 6929–6936, Dezembro 1993a.

KIRNBAUER, R. et al. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. **Journal of Virology**, v. 67, n. 12, p. 6929–6936, dez. 1993b.

KLUG, S. J. et al. TP53 codon 72 polymorphism and cervical cancer: a pooled analysis of individual data from 49 studies. **The Lancet Oncology**, v. 10, n. 8, p. 772–784, Agosto 2009.

LEE, K. Y.; BROKER, T. R.; CHOW, L. T. Transcription factor YY1 represses cell-free replication from human papillomavirus origins. **Journal of Virology**, v. 72, n. 6, p. 4911–4917, jun. 1998.

LEHTINEN, M. et al. Overall efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against grade 3 or greater cervical intraepithelial neoplasia: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 1, p. 89–99, jan. 2012.

LI, N. et al. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. **International Journal of Cancer**, v. 128, n. 4, p. 927–935, 15 fev. 2011.

LIU, J. et al. Variations of human papillomavirus type 58 E6, E7, L1 genes and long control region in strains from women with cervical lesions in Liaoning province, China. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 12, n. 7, p. 1466–1472, out. 2012.

LIU, M. et al. The Distribution and Common Amino Acid Polymorphisms of Human Papillomavirus (HPV)-31 Variants in 2700 Women from Northern China. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e99141, 5 jun. 2014.

LONDESBOROUGH, P. et al. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 69, n. 5, p. 364–368, 21 out. 1996.

LÓPEZ-REVILLA, R. et al. Human papillomavirus type 16 variants in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma in San Luis Potosí City, Mexico. **Infectious agents and cancer**, v. 4, p. 3, 2009.

MACLAUGHLAN, S. D.; LACHANCE, J. A.; GJELSVIK, A. Correlation between smoking status and cervical cancer screening: a cross-sectional study. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, v. 15, n. 2, p. 114–119, abr. 2011.

MALAGÓN, T. et al. Cross-protective efficacy of two human papillomavirus vaccines: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 12, n. 10, p. 781–789, out. 2012.

MA, Y. T. et al. Smoking initiation is followed by the early acquisition of epigenetic change in cervical epithelium: a longitudinal study. **British Journal of Cancer**, v. 104, n. 9, p. 1500–1504, 26 abr. 2011.

MCBRIDE, A. A. The Papillomavirus E2 proteins. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 57–79, out. 2013.

MERCK. Merck's investigational 9-valent HPV vaccine, V503, prevented 97 percent of cervical, vaginal and vulvar pre-cancers caused by five additional HPV types, in phase III study. <http://www.mercknewsroom.com/news-release/research-and-development-news/mercks-investigational-9-valent-hpv-vaccine-v503-prevente#sthash.7JM6dqGa.dpuf>. (accessed November 30, 2014).

MOKTAR, A. et al. Cigarette smoke condensate-induced oxidative DNA damage and its removal in human cervical cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 39, n. 4, p. 941–947, out. 2011.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature reviews. Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550–560, ago. 2010.

MUÑOZ, N. et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 6, p. 518–527, 2003.

NASIR, L. et al. Identification and functional analysis of sequence variants in the long control region and the E2 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 isolated from equine sarcoids. **Virology**, v. 364, n. 2, p. 355–361, 1 ago. 2007.

NTOVA, C. K. et al. Genetic Variability and Phylogeny of High Risk HPV Type 16, 18, 31, 33 and 45 L1 Gene in Greek Women. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 12, p. 1–17, 22 dez. 2011.

O'CONNOR, M.; BERNARD, H.-U. Oct-1 activates the epithelial-specific enhancer of human papillomavirus type 16 via a synergistic interaction with NF1 at a conserved composite regulatory element. **Scopus**, 1995.

OLIVEIRA, S. et al. The p53 R72P polymorphism does not influence cervical cancer development in a portuguese population: A study in exfoliated cervical cells. **Journal of Medical Virology**, v. 80, n. 3, p. 424–429, 1 mar. 2008.

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. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 3, p. 1060–1066, 1 mar. 2008.

PILLAI, M. R. et al. Molecular variants of HPV-16 associated with cervical cancer in Indian population. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 125, n. 1, p. 91–103, 1 jul. 2009.

PIROG, E. C. et al. HPV prevalence and genotypes in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma, a worldwide analysis of 760 cases. **Modern Pathology**, v. 27, n. 12, p. 1559–1567, dez. 2014.

PITTA, D. R. et al. Prevalence of HPV 16, 18, 45 and 31 in women with cervical lesions. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, n. 7, p. 315–320, jul. 2010.

PITTAYAKHAJONWUT, D.; ANGELETTI, P. C. Viral trans-factor independent replication of human papillomavirus genomes. **Virology Journal**, v. 7, p. 123, 2010.

PRADO, J. C. et al. Worldwide genomic diversity of the human papillomaviruses-53, 56, and 66, a group of high-risk HPVs unrelated to HPV-16 and HPV-18. **Virology**, v. 340, n. 1, p. 95–104, 15 set. 2005.

QUINT, K. D. et al. HPV genotyping and HPV16 variant analysis in glandular and squamous neoplastic lesions of the uterine cervix. **Gynecologic oncology**, v. 117, n. 2, p. 297–301, maio 2010.

RABELO-SANTOS, S. et al. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiânia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 2, p. 181–184, mar. 2003.

RAIOL, T. et al. Genetic variability and phylogeny of the high-risk HPV-31, -33, -35, -52, and -58 in central Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 81, p. 685–692, abr. 2009.

ROH, J.-W. et al. p53 Codon 72 and p21 Codon 31 Polymorphisms and Susceptibility to Cervical Adenocarcinoma in Korean Women. **Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics**, v. 18, n. 9, p. 453–459, 2010a.

ROH, J.-W. et al. P53 codon 72 and p21 codon 31 polymorphisms and susceptibility to cervical adenocarcinoma in Korean women. **Oncology Research**, v. 18, n. 9, p. 453–459, 2010b.

ROMAN, A.; MUNGER, K. The papillomavirus E7 proteins. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 138–168, out. 2013.

SAFAEIAN, M. et al. Chlamydia trachomatis and risk of prevalent and incident cervical premalignancy in a population-based cohort. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 102, n. 23, p. 1794–1804, 1 dez. 2010.

SAPP, M.; DAY, P. M. Structure, attachment and entry of polyoma- and papillomaviruses. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 400–409, 20 fev. 2009.

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. 3159–3169, Abril 2010.

SCHIFFMAN, M.; CLIFFORD, G.; BUONAGURO, F. M. Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. **Infectious Agents and Cancer**, v. 4, n. 1, p. 8, 1 jun. 2009.

- SCHLECHT, N. F. et al. Variants of human papillomaviruses 16 and 18 and their natural history in human immunodeficiency virus-positive women. **The Journal of general virology**, v. 86, n. Pt 10, p. 2709–2720, out. 2005.
- SCHMIDT, M.; KEDZIA, W.; GOŹDZICKA-JÓZEPIAK, A. Intratype HPV16 sequence variation within LCR of isolates from asymptomatic carriers and cervical cancers. **Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 23, n. 1-2, p. 65–77, dez. 2001.
- SCHWARTZ, S. Papillomavirus transcripts and posttranscriptional regulation. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 187–196, out. 2013.
- SEN, E.; BROMBERG-WHITE, J. L.; MEYERS, C. Genetic Analysis of cis Regulatory Elements within the 5' Region of the Human Papillomavirus Type 31 Upstream Regulatory Region during Different Stages of the Viral Life Cycle. **Journal of Virology**, v. 76, n. 10, p. 4798–4809, 15 maio 2002.
- SHANG, Q. et al. Human Papillomavirus Type 16 Variant Analysis of E6, E7, and L1 Genes and Long Control Region in Identification of Cervical Carcinomas in Patients in Northeast China. **J. Clin. Microbiol.**, v. 49, n. 7, p. 2656–2663, 1 jul. 2011.
- SHEN, M. et al. Sequence variation analysis of HPV-18 isolates in southwest China. **PLoS one**, v. 8, n. 2, p. e56614, 2013.
- SICHERO, L. et al. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 120, n. 8, p. 1763–1768, 15 abr. 2007.
- SICHERO, L.; FRANCO, E. L.; VILLA, L. L. Different P105 Promoter Activities among Natural Variants of Human Papillomavirus Type 18. **Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 5, p. 739–742, 1 mar. 2005.
- SICHERO, L.; SOBRINHO, J. S.; VILLA, L. L. Identification of Novel Cellular Transcription Factors that Regulate Early Promoters of Human Papillomavirus Types 18 and 16. **Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 6, p. 867–874, 15 set. 2012.
- 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, jun. 2006.
- SINGH, H.; RAGHAVA, G. P. ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 17, n. 12, p. 1236–1237, dez. 2001.
- SINGH, H.; RAGHAVA, G. P. S. ProPred1: prediction of promiscuous MHC Class-I binding sites. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 19, n. 8, p. 1009–1014, 22 maio 2003.
- SMITH, B. et al. Sequence Imputation of HPV16 Genomes for Genetic Association Studies. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. e21375, 23 jun. 2011.

- SONG, Y. S. et al. Major Sequence Variants in E7 Gene of Human Papillomavirus Type 16 from Cervical Cancerous and Noncancerous Lesions of Korean Women. **Gynecologic Oncology**, v. 66, n. 2, p. 275–281, Agosto 1997.
- STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 233–241, jun. 1996.
- STEWART, A. C. et al. Intratype variation in 12 human papillomavirus types: a worldwide perspective. **Journal of Virology**, v. 70, n. 5, p. 3127–3136, maio 1996.
- SUN, Z. et al. Genetic Diversity of HPV-16 E6, E7, and L1 Genes in Women With Cervical Lesions in Liaoning Province, China. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 21, n. 3, p. 551–558, abr. 2011.
- TABRIZI, S. N. et al. Assessment of herd immunity and cross-protection after a human papillomavirus vaccination programme in Australia: a repeat cross-sectional study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 10, p. 958–966, out. 2014.
- TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, 4 maio 2011.
- TERMINI, L.; VILLA, L. Biomarcadores na Triagem do Câncer do Colo Uterino. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 20, n. 2, p. 125–131, 2008.
- TESHIMA, H. et al. Human papillomavirus type 18 DNA sequences in adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the uterine cervix. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 259, n. 4, p. 169–177, 1997.
- TORNESELLO, M. L. et al. Analysis of human papillomavirus type-16 variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. **Journal of Medical Virology**, v. 74, n. 1, p. 117–126, set. 2004.
- TOUZE, A. et al. The L1 Major Capsid Protein of Human Papillomavirus Type 16 Variants Affects Yield of Virus-Like Particles Produced in an Insect Cell Expression System. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 7, p. 2046–2051, 1 jul. 1998.
- TRIMBLE, C. L. et al. Active and passive cigarette smoking and the risk of cervical neoplasia. **Obstetrics and Gynecology**, v. 105, n. 1, p. 174–181, jan. 2005.
- UEDA, M. et al. Murine double-minute 2 homolog single nucleotide polymorphism 309 and the risk of gynecologic cancer. **Human Cell**, v. 22, n. 2, p. 49–54, 1 maio 2009.
- VACCARELLA, S. et al. Worldwide trends in cervical cancer incidence: Impact of screening against changes in disease risk factors. **European Journal of Cancer**, v. 49, n. 15, p. 3262–3273, 1 out. 2013.
- VANDE POL, S. B.; KLINGELHUTZ, A. J. Papillomavirus E6 oncoproteins. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 115–137, out. 2013.

- VAN DOORSLAER, K. Evolution of the Papillomaviridae. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 11–20, out. 2013.
- VERESS, G. et al. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. **Journal of General Virology**, v. 80, n. 4, p. 1035–1043, 1 abr. 1999.
- VERÍSSIMO FERNANDES, J. et al. Human papillomavirus prevalence in women with normal cytology and with cervical cancer in Natal, Brazil. **Molecular Medicine Reports**, v. 4, n. 6, p. 1321–1326, dez. 2011.
- VILLA, L. L. et al. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. **The Journal of General Virology**, v. 81, n. Pt 12, p. 2959–2968, dez. 2000.
- VRTAČNIK BOKAL, E. et al. Genomic variants of human papillomavirus genotypes 16, 18, and 33 in women with cervical cancer in Slovenia. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 36, n. 6, p. 1204–1213, 1 dez. 2010.
- WANG, J. W.; RODEN, R. B. S. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 175–186, out. 2013.
- WARD, K. K.; BERENSON, A. B.; BREITKOPF, C. R. Passive smoke exposure and abnormal cervical cytology in a predominantly Hispanic population. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 204, n. 3, p. 213.e1–6, mar. 2011.
- WHEELER, C. M. et al. Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 11–19, jan. 1997.
- WHEELER, C. M. et al. Cross-protective efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by non-vaccine oncogenic HPV types: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 1, p. 100–110, jan. 2012.
- WHO | Strengthening cervical cancer prevention and control.
http://www.who.int/reproductivehealth/publications/cancers/rhr_10_13/en/index.html
 . Accessed 20 Sep 2011
- WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). (2010) Human Papillomavirus and Related Cancers in Brazil.
- WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 1, p. 11–22, jan. 2007.
- WU, Y. et al. Analysis of mutations in the E6/E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolates from China. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 5, p. 1181–1188, Maio 2006.

XI, L. F. et al. Genomic Variation of Human Papillomavirus Type 16 and Risk for High Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, n. 11, p. 796–802, 4 jun. 1997.

XI, L. F. et al. Risk of anal carcinoma in situ in relation to human papillomavirus type 16 variants. **Cancer Research**, v. 58, n. 17, p. 3839–3844, 1 set. 1998.

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: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 16, n. 1, p. 4–10, jan. 2007.

XI, L. F. et al. Association of human papillomavirus type 31 variants with risk of cervical intraepithelial neoplasia grades 2-3. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 131, n. 10, p. 2300–2307, 15 nov. 2012.

XIN, C. Y. et al. Analysis of E6 variants of human papillomavirus type 33, 52 and 58 in Japanese women with cervical intraepithelial neoplasia/cervical cancer in relation to their oncogenic potential. **Cancer Letters**, v. 170, n. 1, p. 19–24, Settembre 2001.

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

YUE, Y. et al. Genetic variability in L1 and L2 genes of HPV-16 and HPV-58 in Southwest China. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e55204, 2013.

ZANDBERG, D. P. et al. The role of human papillomavirus in nongenital cancers. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 63, n. 1, p. 57–81, jan. 2013.

ZEHBE, I. et al. p53 codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development. **Cancer Research**, v. 61, n. 2, p. 608–611, 15 jan. 2001.

ZEHBE, I. et al. Rare human papillomavirus 16 E6 variants reveal significant oncogenic potential. **Molecular Cancer**, v. 10, p. 77, 2011.

ZUNA, R. E. et al. HPV16 variant lineage, clinical stage, and survival in women with invasive cervical cancer. **Infectious Agents and Cancer**, v. 6, n. 1, p. 19, 28 out. 2011.

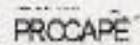
ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1288, n. 2, p. F55–78, 9 out. 1996.

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

ANEXOS

APÊNDICES

Apêndice I



COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS COMPLEXO HOSPITALAR HUOC/PROCAPE

Reunião: 25/05/2010

Protocolo CEP – HUOC/PROCAPE: nº 64/2010
CAAE: 0058.0.106.000-10

Projeto: Avaliação dos polimorfismos dos oncogenes E6 e E7 dos HPVs 16, 18, 31 e os polimorfismos nos genes IL10, MBI.2, TNFalfa e TP53 em pacientes do Centro de Oncologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz: Um estudo voltado à políticas públicas de impacto social.

Pesquisador Principal: Maria Tereza Cartaxo Muniz

Resultado:

- Resultado do Projeto – **APROVADO**

Magaly Bushatsky
Vice-coordenadora
CEP-HUOC/PROCAPE

Apêndice II



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Comitê de Ética em Pesquisa

Av. da Engenharia, s/n - 1º Andar, Cal. Universitária, CEP 50740-600, Recife - PE.

Tel/fax: 81 2126 8588 - www.ufpe.br/ceps e-mail: cepccs@ufpe.br

Of. Nº. 231/2012 - CEP/CCS

Recife, 13 de abril de 2012

A

Prof. Iví Gonçalves Soares Santos Serra
Departamento de Histologia e Embriologia – CCS/UFPE

Registro do SISNEP FR - 475061 CAAE – 0483.0.172.000-11 Registro CEP/CCS/UFPE Nº 491/11 Título: Comparação do desempenho entre citopatologia, coloscopia e achados histopatológicos nas lesões do colo uterino Pesquisador Responsável: Iví Gonçalves Soares Santos Serra

Senhor (a) Pesquisador (a):

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, as modificações do protocolo de pesquisa em epígrafe.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente


Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS / UFPE

Apêndice III



Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental



Pesquisa (Pacientes)

I) Informações Pessoais:

Nome: _____ Idade:

Município: _____ Estado: _____

Raça / Cor: Branca Negra Parda Amarela

Zona Rural Urbana

Estado Civil: Solteira Viúva
 Casada Ignorando

II) Fatores Interferentes:

Idade da 1ª relação sexual: Número de gestações:
Idade da 1ª gestação: Número de parcerias:

Uso de anticoncepcional hormonal? Sim Não
Qual? _____

Metodo contraceptivo atual
Qual? _____

Uso atual de medicações Sim Não
Qual? _____
Tempo? _____

Fuma? Sim Não
Ex-fumante Há quanto tempo: Quantos cigarros/dia:

DST? Sim Não
Quais? HIV/AIDS Hepatite B Sífilis
 Outros: _____

Número de partos
Vaginal Césareas

Bebidas alcoólicas: Nunca Sim
 Não agora, mas já consumi

III) Exames Preventivos:

Exame preventivo Sim Não
Idade do 1º preventivo:

Exame	Observação
Papanicolaou <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	_____
Colposcopia <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	_____
Vulvosopia <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	_____
Anoscopia <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	_____

IV) Tipo de Lesão:

Verruga
 Lesão precursora Qual? _____
 Câncer Qual? _____

Localização da lesão
 Colo Vulva Retito perineal
 Vagina Âns Outros _____

V) Tipo Histológico: _____

VI) Histórico de Câncer Familiar

Sim Não
Em caso de positivo - Tipo: _____
Ordem de parentesco: _____

Apêndice IV

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

"AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS ONCOGENES E6 E E7 DOS HPV'S 16, 18 E 31 E OS POLIMORFISMOS NOS GENES ALU, ABL, TGF- α E TP53 EM PACIENTES DO CENTRO DE ONCOLOGIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO-OSWALDO CRUZ: UM ESTUDO VOLTADO A POLÍTICAS PÚBLICAS DE IMPACTO SOCIAL."

Prezado paciente: _____

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa sobre o papilomavírus humano, também chamado de HPV, principal causa do câncer de colo uterino. Este projeto será realizado em Recife-PE, iniciando-se em 2010, com término previsto para 2014.

Com este estudo saberemos a porcentagem de mulheres que apresentam o HPV e os fatores relacionados ao desenvolvimento do câncer de colo uterino na população de Recife e poderemos elaborar, juntamente com as equipes do SUS, um Programa de controle do câncer de colo de útero.

Se você quiser participar, deverá realizar um exame ginecológico no qual será coletada uma amostra de material do colo do útero para teste citológico e molecular. Será realizada também uma coleta única de amostra de sangue, onde poderão ser determinadas características genéticas (características que vem de nossos pais) que possam estar associadas com alterações que poderão estar ligadas ao câncer de colo do útero. A coleta será realizada por profissional habilitado e com a solicitação de seu médico. Este material será dividido em pequenas quantidades e armazenado no Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE – UFPE) e no Laboratório de Oncologia do CEON-UPE, devendo ser utilizado exclusivamente para as finalidades acima.

Os procedimentos utilizados não apresentam risco habitual, visto serem de rotina da clínica e do Laboratório. Para diminuir os riscos, todo o material utilizado será descartado, seguindo as normas de biosegurança estabelecidas.

Sua participação neste projeto é voluntária. Você pode abandonar o estudo em qualquer momento sem que isto lhe cause qualquer prejuízo, inclusive no seu acompanhamento. Todos os exames e consultas médicas serão gratuitos e realizados pelas unidades envolvidas no presente projeto (Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental – UFPE e Laboratório de Oncologia do CEON - UPE), seguindo rigorosamente os critérios.

Todos os dados obtidos serão mantidos em sigilo, cabendo apenas a você e ao médico responsável, o conhecimento deles. Você poderá esclarecer qualquer dúvida com o Prof. Antonio Carlos de Freitas, de segunda a sexta-feira, das 8h às 11h e das 13h às 17h, no Departamento de Genética da UFPE, pelo telefone (51) 2126-8921 e pelo e-mail: antonio.freitas@pq.cnpq.br ou com a Prof. Maria Tereza Carreto Menezes, de segunda a sexta-feira, das 8h às 11h e das 14h às 16h, no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Oncologia Pediátrica (CEON-UPE), pelo telefone (51) 3154-1314 (Ramal 160) e pelo e-mail: marctm@ig.ig.com. Desde já, agradecemos a sua colaboração.

Eu, _____, após ser esclarecido sobre o projeto de pesquisa, concordo em participar do estudo acima.

Assinatura do Paciente: _____

Assinatura do Coordenador: _____

Recife, _____ de _____ de 2010