

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR
TESE DE DOUTORADO**

**Avaliação de 4 tipos de Papilomavírus humano na
região metropolitana do Recife (PE) e a incidência
de câncer cervical: discussão da relação entre os
tipos virais com as vacinas profiláticas**

MARIA FERNANDA PIFFER TOMASI BALDEZ DA SILVA

**RECIFE
2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR
TESE DE DOUTORADO**

**Avaliação de 4 tipos de Papilomavírus humano na região
metropolitana do Recife (PE) e a incidência de câncer cervical:
discussão da relação entre os tipos virais e as vacinas profiláticas**

MARIA FERNANDA PIFFER TOMASI BALDEZ DA SILVA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do grau de Doutor em Genética pela UFPE

Orientador: Prof. Dr. Willy Beçak

Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas

**RECIFE
2009**

Silva, Maria Fernanda Piffer Tomasi Baldez da
Avaliação de 4 tipos de Papilomavírus humano na região metropolitana do Recife (PE) e a incidência de câncer cervical: discussão da relação entre os tipos virais com as vacinas profiláticas./ Maria Fernanda Piffer Tomasi Baldez da Silva. – Recife: O Autor, 2009

101 folhas: il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Departamento de Genética, 2009.

Inclui bibliografia e anexo

1. Papilomavírus humano. 2. Câncer cervical. 3. HPV- vacinas profiláticas. I Título.

614.581

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB – 2009- 199

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Parecer da comissão examinadora da tese de:
Maria Fernanda Piffer Tomasi Baldez da Silva

intitulada:

Avaliação de 4 tipos de Papilomavírus humano na região metropolitana do Recife (PE) e a incidência de câncer cervical: discussão da relação entre os tipos virais com as vacinas profiláticas.

A comissão examinadora considera o presente trabalho
APROVADO

Portanto, cumpridas todas as exigências regimentais, Maria Fernanda Piffer Tomasi Baldez da Silva faz jus ao grau de Doutor em Genética e Biologia Molecular pela
UFPE. Recife, 25/11/2009


1º Examinador: Profª Dra. Neide Santos

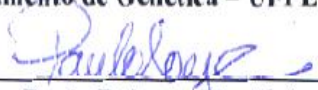
Departamento de Genética - UFPE


2º Examinador: Profº Dr. Valdir de Queiroz Balbino

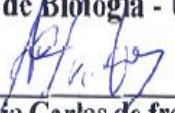
Departamento de Genética -- UFPE


3º Examinador: Profº Dr. Tercílio Calça Júnior

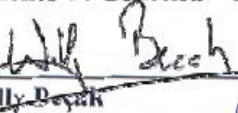
Departamento de Genética - UFPE


4º Examinador: Profº Dr. Paulo Roberto Elcutério de Souza

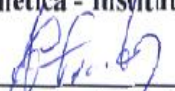
Departamento de Biologia - UFRPE


5º Examinador: Profº Dr. Antonio Carlos de Freitas

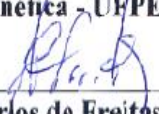
Departamento de Genética - UFPE


Orientador: Profº Dr. Willy Beyak

Departamento de Genética - Instituto Butantan


Co-orientador: Profº Dr. Antonio Carlos de Freitas

Departamento de Genética - UFPE


Coordenador: Profº Dr. Antonio Carlos de Freitas

Departamento de Genética - UFPE

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Willy Beçak e Prof. Dra. Rita de Cassia Stocco, pela confiança dada a mim, pela oportunidade de me tornar parte deste processo. Ao Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas pelos ensinamentos e pela valiosa orientação, e, por acreditar e confiar em mim, me apoiando e ajudando a superar as dificuldades.

Ao Prof. Dr. Sergio Crovella pelos ensinamentos e orientações neste processo de aprendizagem. Obrigada por sempre estar presente ajudando e me apoiando. Tornou-se um grande amigo!

Aos Dr. José Luís de Lima Filho, Dr. Luiz Cláudio Arraes de Alencar e Dra. Bruneska pelo apoio e incentivo, sempre se mostrando prestativos. À médica Vilma Guimarães e Letícia Kartz pela disponibilização das amostras e dados clínicos.

Obrigada aos amigos nordestinos Julia Campos, Mirela D'ark, André Luiz, Janaíne, Rafaelle, Helder Melo, Angélica, Cybelle, Bárbara, Eliane, Elaine, Fernanda Bezerra, Felipe, Filipe, Renato, Esteban, Rochane, Billy, Brígida, Rute e Meiriana. Vocês, cada um ao seu jeito contribuíram para que eu chegasse aqui, me ajudando a caminhar numa fase nova que se iniciou com minha mudança para Recife. Agradeço às amigas de apartamento Sinara, Aline, Angélica, Rafaelle e Isadora pelo companheirismo e troca de experiências.

Aos biólogos Rafael Guimarães e Lucas Brandão, que fazem parte do grupo HPV do LIKA, do Setor de Virologia, dividindo comigo uma boa parte da realização deste projeto, trabalhando de forma interativa e divertida.

Aos meus pais, Joaquim Baldez e Ilce Maria Piffer, e ao meu irmão José Eduardo Brasileiro, pelo amor incondicional, e luta eterna para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

A algumas pessoas que marcaram de alguma forma minha vida e me ajudaram a crescer e amadurecer. A essas pessoas que me viram sorrir e chorar e que havendo contato ainda ou não, jamais serão esquecidas. A todos, muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
Lista de Abreviaturas	i
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	iv
Resumo	v
Abstract	vi
1. Introdução	7
2. Revisão da Literatura	8
2.1. Histórico do papilomavírus humano	8
2.2. Classificação e taxonomia viral	9
2.3. Biologia molecular do papilomavírus humano	12
2.4. Ciclo infeccioso e patogenia viral	18
2.5. Citologia viral	22
2.6. Co-fatores de infecção viral	25
2.7. Câncer cervical e vacinas profiláticas	32
2.8. Incidência de câncer no Brasil e no mundo	38
3. Objetivos	42
4. Material e Métodos	43
4.1. Material	43
4.2. Métodos	44
4.2.1. Grupo controle negativo	44
4.2.2. Grupo controle para confirmação do funcionamento dos <i>primers</i> e amostras tipo-específicas	44
4.2.2.1. Amplificação da amostra clínica HPV 31 para posterior clonagem	46
4.2.2.3. Clonagem do gene L1H31 em vetor pGEM T <i>Easy</i> – ligação do inserto no vetor	47
4.2.2.4. Transformação bacteriana e extração plasmidial de pGEM L1H31 em <i>Escherichia coli</i> Top 10	47
4.2.3. Grupo controle positivo	48
4.2.4. Grupo de estudo	48
4.2.4.1. Extração do DNA genômico das amostras dos pacientes	49
4.2.4.2. Amplificação do DNA viral para detecção viral	50

4.2.4.3. Amplificação do DNA viral para tipificação viral	51
4.2.4.4. Análise citológica cérvico-vaginal randômica das lesões	52
4.2.4.5. Análise dos locais das lesões	53
5. Resultados	54
5.1. Amplificação da amostra clínica HPV 31 para posterior clonagem	54
5.2. Clonagem do gene L1H31 em vetor pGEM T <i>Easy</i> – ligação do inserto no vetor	54
5.3. Transformação bacteriana e extração plasmidial de pGEM L1H31 em <i>Escherichia coli</i> Top 10	55
5.4. Detecção viral das amostras do grupo de estudo	56
5.5. Tipificação viral das amostras do grupo de estudo	57
5.6. Análise citológica cérvico-vaginal das amostras randômicas das pacientes do grupo de estudo	59
5.7. Análise dos locais das lesões das amostras das pacientes do grupo de estudo	60
6. Discussão	62
7. Conclusões	73
8. Referências Bibliográficas	75
9. Anexos	100
9.1. Artigo 01: Association between <i>MBL12</i> gene functional polymorphisms and high risk HPV infection in Brazilian women	100
9.2. Artigo 02: Incidence of HPV31 and HPV33 in cervical samples collected from women randomly selected in Recife, (Pernambuco, Brazil)	101
10. Memorial da aluna	102

Lista de abreviaturas

LIAG	lesão intraepitelial de alto grau
LIBG	lesão intraepitelial de baixo grau
AGUS	<i>atypical glandular class of indetermined significance</i>
AP-1	proteína ativadora-1
APC	célula apresentadora de antígeno
Arg	Arginina
ASCUS	<i>atypical squamous cells of indetermined significance</i>
BPV	papilomavírus bovino
CIN e NIC	carcinoma intraepitelial cervical
CKI	quinase dependente de ciclina
COPV	papilomavírus oral canino
CRPV	papilomavírus de coelho
CSF	fator estimulador de colônia
DC	células dentríticas
DNA	ácido desoxirribonucléico
E	gene que codifica proteína <i>Early</i>
E2F	fator de transcrição E2
E6AP	complexo E6 ligase ubiquitina celular
EGFR	receptor do fator de crescimento epidermal
EVER ou TMC	<i>loc</i> de susceptibilidade ao câncer
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HPV	papilomavírus humano
HSIL	lesão intraepitelial escamosa de alto grau
Ig	anticorpo neutralizante tipo específico
IL10	interleucina 10
KDa	Quilodalton
L	gene que codifica proteína <i>Late</i>
LCR	longa região de controle
LSIL	lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
MAP	via de diferenciação e divisão celular
MHC	complexo de histocompatibilidade principal
MTHFR	metilenetetrahydrofolato redutase
NF-1	<i>Nuclear factor -1</i>

ORF	<i>open reading frame</i>
p16	Inibidor de CKI
p21	proteína 21, supressora de tumor
p53	proteína 53, supressora de tumor
PCR	reação de polimerização em cadeia
PDZ	proteína de sinalização celular
pRB	proteína do retinoblastoma
Pro	prolina
RNA_m	ácido ribonucléico mensageiro
SIL	Lesão intraepitelial escamosa
STAT	via de transdução de sinal
URR	<i>upstream regulatory region</i>
UV	ultravioleta
VLP	partícula semelhante ao vírus (``Virus-like particle´´)
TACIN	vacina de proteína quimérica L2/E6/E7
TAHPV	vacina contendo proteínas E6 e E7 de HPV16 e 18 modificadas

Lista de Figuras

	Página
Revisão da Literatura	
Figura 1. Lesões clínicas provocadas por HPV	09
(A) Papilomas no trato genital feminino	09
(B) Papilomas na região peniana	09
(C) Colo do útero com lesão	09
Figura 2. Árvore filogenética contendo 118 tipos de papilomavírus	11
Figura 3. Esquema do genoma do HPV	13
(A) Disposição dos genes precoces (E), dos genes tardios (L) e da região regulatória upstream (URR)	13
(B) Representação esquemática do papilomavírus	13
Figura 4. Esquema da interferência da proteína <i>E6</i> no ciclo celular.	16
(A) atuação da proteína p53 na célula	16
(B) Complexo E6AP-E6	16
Figura 5. Esquema da interferência do gene <i>E7</i> no ciclo celular.	17
(A) Atuação da proteína Rb com o fator E2F	17
(B) Complexo E7pRb	17
Figura 6. Ciclo replicativo do HPV	19
Figura 7. Evolução da lesão cervical pré-maligna ao câncer invasivo	24
Figura 8. Modelo da infecção pelo HPV e câncer cervical	24
Figura 9. Esquema simplificado da estrutura dos genes do sistema MHC humano	26
Figura 10. (A) Modelo do capsídeo do papilomavírus	34
(B) Partículas virais	34
(C) L1 <i>virus-like particles</i> (VLP)	34
Resultados	
Figura 11. Amplificação da amostra coletada de paciente positiva para HPV 31 com enzima de alta fidelidade	54
Figura 12. Extração e digestão plasmidial de pGEM1H31	55
Figura 13. Detecção em algumas mulheres com uso de <i>primers</i> MY09/MY11 e <i>primers</i> PC04/GH20	56
Figura 14. Resultado ilustrativo da tipificação viral de algumas amostras	58

Lista de Tabelas

	Página
Revisão da Literatura	
Tabela 1. Cronologia dos principais eventos/fatos envolvidos no estudo do papilomavírus humano e o câncer cervical	8
Tabela 2. Classificação epidemiológica dos tipos de HPV	12
Tabela 3. Principais funções das proteínas do papilomavírus humano	13
Tabela 4. Equivalência de nomenclaturas citológicas e histológicas das lesões pré-invasivas de câncer cervical uterino	23
Tabela 5. Tipos de vacinas disponíveis no mercado	36
Tabela 6. Distribuição dos genótipos mais incidentes nas diferentes regiões brasileiras	40
Métodos	
Tabela 7. <i>Primers</i> e seqüências utilizadas na detecção do papilomavírus humano	50
Tabela 8. <i>Primers</i> e seqüências de oligonucleotídeos utilizadas na tipificação do papilomavírus humano	52
Resultados	
Tabela 9. Distribuição das 617 amostras de mulheres analisadas quanto à detecção viral	56
Tabela 10. Distribuição das 396 amostras de mulheres positivas analisadas quanto à detecção e tipificação viral	58
Tabela 11. Distribuição dos 396 amostras de mulheres positivas analisadas quanto à infecção conjunta	59
Tabela 12. Relação do tipo viral com tipo de lesão	60
Tabela 13. Relação do tipo viral com local de extração das lesões	61

Resumo

Existe uma relação bem definida entre os diferentes tipos de papilomavirus humano e a incidência de câncer cervical na região metropolitana do Recife, Pernambuco assim como em outras Regiões do Brasil. O conhecimento que se tem hoje a respeito do papilomavírus humano é muito amplo quando se fala de genoma viral, modo de infecção, estágios de progressão da doença e atualmente processos vacinas. Porém, quando se fala de um vírus tão comumente disseminado pela população, mas que apresenta diferentes aspectos em relação a características específicas quanto ao país, tipo celular e tipo viral, os estudos têm de ser diferentemente estruturados. Nosso estudo avaliou a incidência dos diferentes tipos de HPV e sua relação com tipo de lesão em amostras de material cervical de pacientes recebidas em unidade do Serviço de Saúde Público da região metropolitana de Recife para os tipos mais prevalentes. Pudemos comprovar que existe uma alta incidência do HPV 16, seguidos pelos tipos 31 e 33, diferentemente das demais regiões brasileiras. Tais dados colocam em questão se as vacinas profiláticas lançadas atualmente no mercado podem ou não atender as necessidades da região metropolitana do Recife (PE).

Palavras-chave: HPV, papilomavírus humano, câncer cervical, genotipagem, vacinas profiláticas.

Abstract

There is a well-defined relationship between the different types of human papillomavirus and the incidence of cervical cancer in the region of Recife, Pernambuco, Brazil. Human papillomavirus is very well known when it comes to viral genome, infection mode, stage of disease progression and currently vaccines. But when we consider of a virus prevalence in the population and special features the infected individuals, geographical distribution, cellular type and viral type, HPV has to be evaluated in many aspects. Our study has evaluated the incidence of HPV viral types and its relationship to cervical cancer in Recife, Brazil. We show that there is high as incidence of HPV 16, followed by the types 31 and 33, differently from other Brazilian regions. These data contribute to the discussion about the previously developed prophylactic vaccines available in the market.

Key-words: papillomavirus, cervical cancer, genotyping, prophylatic vaccines.

1. Introdução

O papilomavírus humano (HPV) é um importante agente cancerígeno podendo afetar o cérvix, vagina, vulva, ânus e pênis, podendo as lesões que causa progredir, resultando em câncer com eventual progressão para metástase. Diversos estudos demonstraram que entre os mais de 100 seqüenciados HPVs, o tipo viral mais comum é o HPV 16 em diversos países, e que o segundo mais comum é o tipo 18. Para esses tipos e para os tipos 6 e 11 já existem vacinas profiláticas. No entanto, no Brasil os dados não coincidem com os de outros países pesquisados. Alguns estudos demonstram que apesar do HPV 16 continuar sendo o mais comum, o segundo mais comum não é o tipo 18 em todas as regiões, havendo diferenças. Enquanto na região Norte, Sul e Sudeste o HPV 18 é o segundo mais comum, nas regiões Central e Nordeste aparentemente são os tipos 31 e 33 os mais prevalentes.

Com esses dados e com estudos relatando que a vacinação contra HPV é profilática e tipo-específico, é muito importante analisar essas diferenças para se iniciar um estudo para o desenvolvimento de uma vacina contra os tipos específicos mais incidentes de cada região.

Estudar os quatro tipos mais prevalentes na região metropolitana do Recife é importante assim como analisar a sua relação com os tipos de lesões que estas mulheres apresentam, ou seja, relacionar o tipo viral com a incidência do câncer cervical. Sua análise é útil ao Sistema Público de Saúde, avaliando os tipos virais mais incidentes em cada região do Brasil e se as vacinas profiláticas disponíveis hoje no mercado seriam as mais apropriadas.

2. Revisão da Litratura

2.1. Histórico do papilomavírus humano

O papilomavírus humano, HPV (*Human Papillomavirus*), é um vírus intensamente estudado e relacionado ao desenvolvimento do câncer cervical (Tabela 1) [Brenna e Syrjänen, 2003]. Os estudos foram iniciados através da observação de uma associação viral com as lesões precursoras do câncer cervical, reconhecidas como verrugas cutâneas (Burd, 2003).

Tabela 1. Cronologia dos principais eventos e/ou fatos envolvidos no estudo do papilomavírus humano e o câncer cervical (Adaptado de Brena e Syrjänen, 2003).

Ano	Descobertas, eventos ou fatos principais
1974-76	Início do postulado entre infecção do HPV e câncer cervical
1977	Isolamento do HPV em verrugas genitais e papiloma laringeal
1981	Deteção do DNA do HPV em neoplasias cervicais
1983	Isolamento e clonagem do HPV 16 de biópsias de cérvix
1984	Isolamento e clonagem do HPV 18 de biópsias de cérvix
1985	Estrutura e transcrição do HPV em células de carcinoma
1987	Primeiros grandes estudos epidemiológicos relacionando infecção e idade
1989	Proposição do modelo das oncoproteínas E6/E7 na transformação celular
1991	IARC e WHO declaram oficialmente a associação entre HPV e câncer cervical

IARC. *International Agency for Research on Cancer*; WHO. *World Health Organization*.

As pesquisas mais relevantes em torno deste vírus foram desenvolvidas pelo virologista Harold zur Hausen, postulando a associação do HPV ao câncer cervical (zur Hausen, 2002; Burd, 2003). Poucos anos mais tarde foi analisado e descrito o HPV

como sendo o agente etiológico do câncer cervical, através da análise dos genes virais específicos; integração do genoma viral e a propriedade dos oncogenes virais na imortalização e transformação celular (zur Hausen, 2002). Porém, somente em 1991 é que ficou claramente reconhecida a associação entre a infecção pelo HPV e o câncer cervical (Montoyama *et al.*, 2004).

Os papilomavírus são descritos como sendo espécie-específicos, infectando mamíferos, répteis, pássaros, entre outros (Doorbar, 2005; Scheurer *et al.*, 2005). Os tipos que atacam os homens são denominados por HPV (*Human Papillomavirus* ou papilomavírus humano) [Fig.1], os tipos específicos a bovinos (BPV - *Bovine Papillomavirus* ou papilomavírus bovino), coelhos CRPV (*Cottontail Rabbit Papillomavirus* ou papilomavírus de coelho) e cães COPV (*Canine Oral Papillomavirus* ou papilomavírus de cão). Outros animais que podem ser infectados são veados, cavalos, hamsters e macacos (Ozbun, 2002).

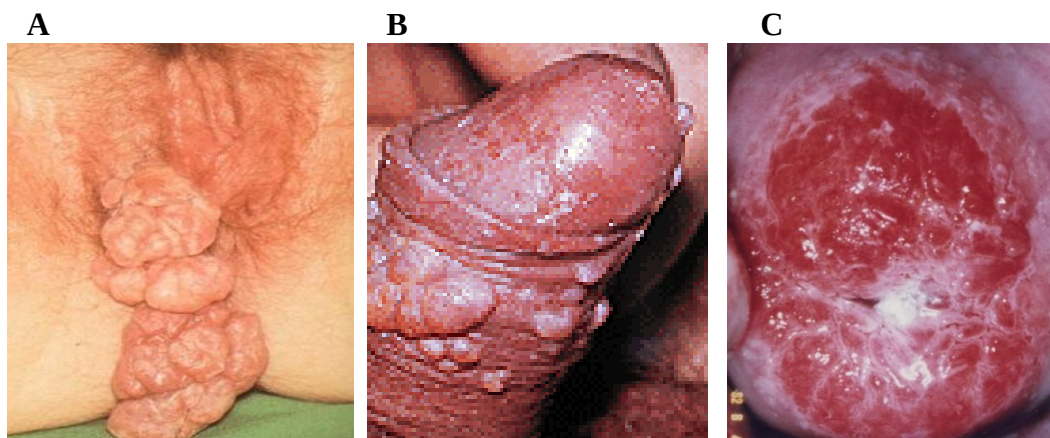


Figura 1. Lesões clínicas provocadas por HPV. (A) Papilomas no trato genital feminino; (B) Papilomas na região peniana; (C) Colo do útero com lesão (Fonte: Pérez-Lopes, 2003).

2.2. Classificação e taxonomia viral

O termo papilomavírus é composto do latim *papila*, projeção ou saliência em forma de mamilo; e da desinescência - oma, usada por antigos médicos gregos para designar tumorações ou intumescimentos. A taxonomia e nomenclatura viral foram elaboradas por um Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV), em que até o sexto relatório publicado, em 1995, os gêneros *Papillomavirus* e *Polyomavirus* constituíam a família *Papovaviridae* (Murphy *et al.*, 1995). A partir do sétimo relatório foi criada a família *Papillomaviridae*, na qual passou a ser incluído o gênero *Papillomavirus* (van Regenmortel *et al.*, 2000).

Existe uma classificação baseada em genótipos feita através de pequenas diferenças encontradas na sequência do gene capsídico *L1* por ser um gene altamente conservado nos diversos papilomavírus humanos, sendo divididos em tipos, com uma diferença de pelo menos 10% na sequência de nucleotídeos do gene *L1*; subtipos, com diferença de 2 a 10%; e variantes, em que a diferença é de no máximo 2%. O termo espécie foi reservado para associações filogenéticas de múltiplos tipos de HPVs dentro de um gênero que mostra de 60 a 70% de identidade da sequência do gene *L1*, com similaridade biológica considerável (de Villiers *et al.*, 2004).

Os dois principais gêneros do papilomavírus humano são os gêneros *Alfa* e *Beta*, com aproximadamente 90% dos HPVs atualmente caracterizados pertencendo a um desses dois gêneros (Fig.2). Existem mais de 200 tipos genotipados de HPV descritos, dos quais aproximadamente 100 foram totalmente seqüenciados (Camillieri e Blundell, 2009) e estão agrupados entre esses dois gêneros, em que aproximadamente 40 são capazes de infectar o trato genital e pertencem ao gênero *Alfa* (Muñoz *et al.*, 2006). Os papilomavírus *Beta* são associados a infecções cutâneas não aparentes em humanos,

porém em indivíduos imunocomprometidos e em pacientes com epidermodisplasia verruciforme hereditária, os vírus podem estar associados ao desenvolvimento de câncer de pele (Harwood e Proby, 2002; Pfister, 2003; Cubie, 2007). Os demais tipos de HPVs restantes pertencem a três gêneros, *Gama*, *Mu* e *Nu*, e geralmente causam papilomas cutâneos que não progridem para câncer (de Villiers *et al*, 2004).

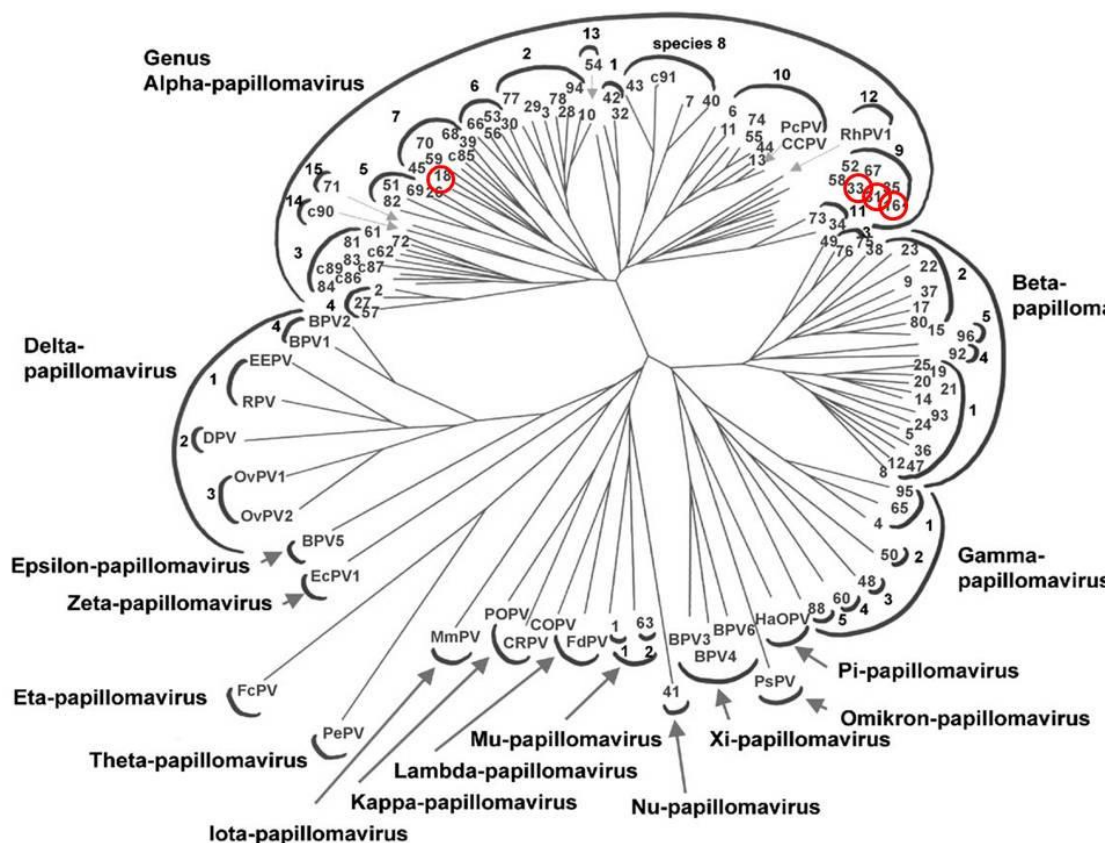


Figura 2. Árvore filogenética contendo 118 tipos de papilomavírus. Em destaque estão os HPVs tipos 16, 18, 31 e 33 (Fonte: De Villiers *et al.*, 2004).

Evidências da associação entre certos tipos de HPV com a etiologia do carcinoma cervical estão bem estabelecidas, sendo que os tipos de papilomavírus humanos podem ainda ser classificados como HPV de alto, médio ou baixo risco (Tabela 2), de acordo com o grau de gravidade das lesões que induzem (Stanley, 2001; Lowndes, 2006; Parkin, 2006). Dados obtidos a partir de diversos estudos promovidos

em diferentes países sobre a associação entre câncer cervical e a infecção pelo HPV classificou 15 tipos de HPV como sendo de alto risco: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82 (Munoz *et al.*, 2003; Baseman e Koutsky, 2005).

Tabela 2. Classificação dos tipos de HPV de acordo com seu risco potencial carcinogênico (Adaptado de zur Hausen, 2006).

Classificação	Tipo viral
Alto risco	16, 18, 39, 45, 56, 58, 59, 68, 73, 82
Médio risco	31, 33, 35, 51, 52
Baixo risco	6, 11, 13, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 70, 72, 74, 81

Embora alguns autores classifiquem os tipos 31, 33, 35, 51 e 52 como sendo de médio risco, estes podem ser incluídos como tipos virais de alto risco pela eventual gravidade de lesões que provocam (Baseman e Koutsky, 2005).

Os tipos virais de alto risco são caracterizados por estarem associados ao desenvolvimento de câncer, inclusive o câncer gástrico e cervical (por exemplo: HPV 16, HPV 18 e HPV 45). Os tipos virais de baixo risco são vírus cujas proteínas codificadas pelos genes *E6* e *E7* possuem baixo potencial de transformação da célula hospedeiras desenvolvendo, portanto, lesões benignas (por exemplo: HPV 6 e HPV 11) [(Baseman e Koutsky, 2005)].

2.3. Biologia molecular do papilomavírus humano

O papilomavírus humano apresenta material genético formado de molécula de DNA, de diâmetro de aproximadamente 55 nm, genoma circular de 8000 pares de bases e capsídeo não envelopado e icosaédrico, composto por dois tipos de proteínas, *L1* e *L2*. O HPV possui pelo menos oito ORFs (*open reading frame*, ou quadro aberto de leitura), divididas em precoces e tardias (Burd, 2003; Zheng e Baker, 2006) [Fig.3], dando a origem a proteínas com funções específicas (Tabela 3).

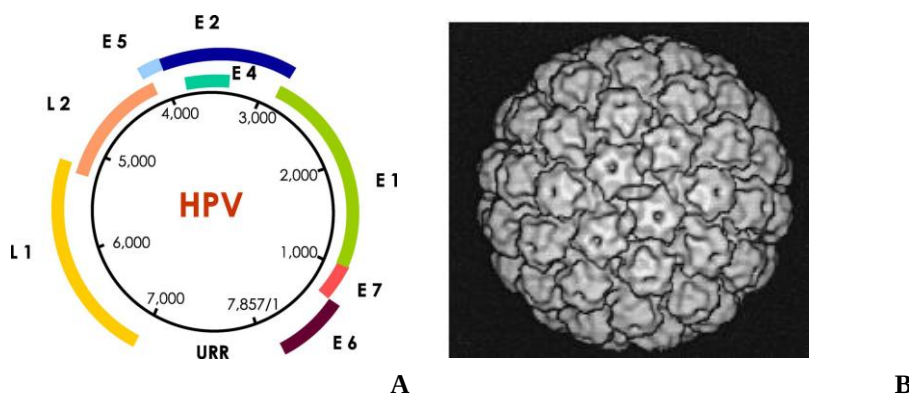


Figura 3. Esquema do genoma do HPV. A. disposição dos genes precoces (*E*), dos genes tardios capsidiais (*L1* e *L2*) e da região regulatória *upstream* (URR); B. Representação esquemática do papilomavírus (Fonte: Muñoz *et al.*, 2006).

Tabela 3. Principais atividades e funções das proteínas do papilomavírus humano (Adaptado de Greenblat (2005); Kim e Yang (2006)).

Proteína	Função/atividade
E1	Replicação do DNA extracromossomal Atividade DNA helicase Atividade ATPase
E2	Regulação da replicação do DNA extracromossomal e da transcrição Controle da transcrição dos genes <i>early</i>
E4	Função não totalmente elucidada Importante no processo de maturação viral
E5	Papel transformante
E6	Papel transformante e imortalizante Inativação de p53
E7	Papel transformante e imortalizante Indução da síntese de DNA Inativação de pRB
L1	Capsídeo protéico maior
L2	Capsídeo protéico menor

Os genes de expressão precoce *E* (*Early*), subdivididos em *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7*, são responsáveis pela codificação de proteínas envolvidas na replicação do DNA viral, controle transcricional e transformação celular. Os genes de expressão tardia *L* (*Late*) codificam as proteínas *L1* e *L2*, que formam o capsídeo viral. Além desses dois grupos de genes existe uma região de controle viral *URR* (*upstream regulatory region*), onde se encontra a origem de replicação viral e seqüências relacionadas à transcrição (Apt *et al.*, 1996; Stanley, 2001; Wright *et al.*, 2006).

A região tardia do genoma do papilomavírus, quase 40% do genoma viral, está situada *downstream* em relação à região precoce e contém as ORFs *L1* e *L2*, que codificam a proteína maior (*L1*) e menor (*L2*) do capsídeo. A proteína *L1* compõe 90% do capsídeo, com peso molecular aparente de 54-58 kDa e se associa à proteína *L2*, com peso molecular aparente de 68-76 kDa (da Silva *et al.*, 2001).

Quando *L2* está presente, a formação de capsídeos virais é 100 vezes mais eficiente o que indica que a proteína *L2* é importante para o empacotamento viral. O gene *L2* também exerce papel fundamental no recrutamento de genomas virais para encapsidação, ligando-se ao DNA viral recém replicado, e em consequência, recrutando *L1* para produção de novos virions (Hebner e Laimins, 2006).

A região *URR*, um segmento de aproximadamente 850 pares de bases (10% do genoma viral), não tem função de codificar proteínas, mas é composta pela origem de replicação, assim como sítios de ligação de múltiplos fatores de transcrição importantes na regulação de promotores virais precoces e tardios (Bernard, 2002).

Os genes *E1* e *E2* possuem importante função de replicação viral e suas respectivas proteínas formam um complexo em torno da origem de replicação, favorecendo o início do processo replicativo viral (Frattoni *et al.*, 1994). O gene *E2* ainda funciona como um regulador do mecanismo de replicação viral dos genes *E6* e

E7, possuindo funções antagônicas, ou seja, *E2* funcionando inibe a função dos genes *E6* e *E7*. Já o gene *E4* expressa uma proteína de fusão com *E1*, sendo responsável por indução do colapso da rede do citoesqueleto, auxiliando na liberação do vírus da célula hospedeira (Doobar, 2006; Gammoh *et al.*, 2009). *E1* e *E4* juntos também contribuem para amplificação genômica do HPV em estágios tardios do ciclo de vida viral, porém este fator não é essencial (Wang *et al.*, 2009).

O gene *E5* codifica proteína que possui capacidade de se ligar às proteínas necessárias para processar antígenos, atuando sobre o sistema imunológico. A ativação de fatores de transcrição, como AP-1 (*Activator Protein-1*) e NF-1 (*Nuclear factor-1*) que estimulam os oncogenes *c-jun* e *c-fos*, respectivamente, também são um mecanismo inerente à *E5*. Além disso, estes fatores (AP-1 e NF-1) apresentam sítios de ligação para a região de regulação transcricional do DNA viral, aumentando a expressão de genes como *E6* e *E7* (Tsai e Chen, 2003). Há evidências de que o gene *E5* também regule negativamente a expressão do gene supressor de tumor *p21*, promovendo proliferação celular (Tsao *et al.*, 1996).

Estudos mostraram ainda que a proteína *E5* também possui uma capacidade de transformação por estar implicada na ativação constitutiva do EGFR (receptor do fator de crescimento epitelial) que por sua vez, ativa vias de transdução de sinal (STAT) [Coffer e Kruijer, 1995], diferenciação e divisão celular (MAP) [(Lewis *et al.*, 1998)].

O gene *E6* tem importante função durante o processo infeccioso. Ele sintetiza proteína que se liga às proteínas supressoras de tumores, p53, responsável pelo reparo do DNA, resultando em sua degradação mediada pela ubiquitina (Wu e Levine, 1994). Para degradar a proteína p53, a proteína *E6* se liga a ligase do sistema ubiquitina celular, formando um complexo E6-AP, que impede a parada do crescimento celular (Fig.4).

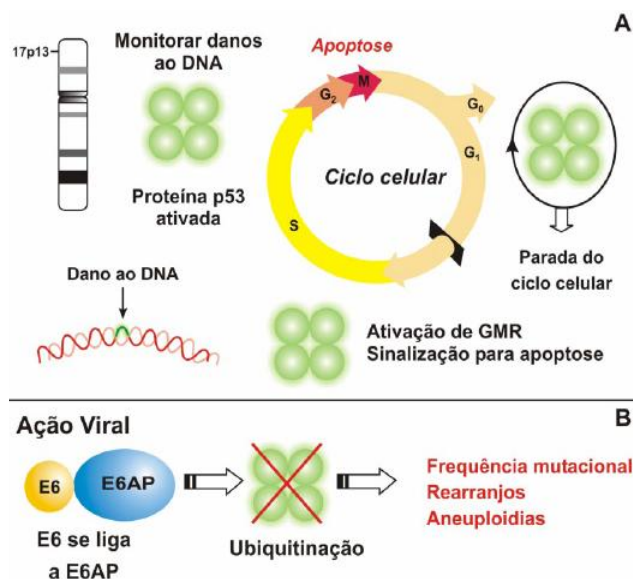


Figura 4. Esquema da interferência do gene *E6* no ciclo celular. (A) atuação da proteína p53 na célula, após ocorrência de dano no DNA, com parada no ciclo celular e ativação de genes de mecanismo de reparo (*GMR*) ou sinalização para apoptose. (B) Complexo E6AP, que resulta na ubiquitinação ou degradação de p53 e conseqüente acúmulo de mutações (Fonte: Silva *et al.*, 2003).

A degradação de p53 também provoca a ativação de uma enzima, a telomerase, responsável pela replicação da região telomérica e inativa em células somáticas. Em células tumorais, a degradação da p53 ativa a superexpressão da telomerase, favorecendo a multiplicação celular contínua (Thomas *et al.*, 1999; Munger *et al.*, 2004; Longworth e Laimins, 2004).

A proteína E6 também pode se ligar a proteínas contendo domínios PDZ, degradando-as. Um domínio PDZ, acrônimo que combina as primeiras letras de três proteínas (**P**SD95, **D**lgA e **z**o-1), é um domínio estrutural encontrado em proteínas sinalizadoras de bactérias, leveduras, plantas e animais. As proteínas PDZ estão envolvidas no processo de sinalização celular e adesão célula-célula. Este processo de degradação pode levar à carcinogênese, já que algumas proteínas PDZ têm função supressora de tumor (Thomas *et al.*, 2002; Hebner e Laimins, 2006).

A proteína E7 também se liga a uma proteína supressora de tumor, porém esta é a pRb, importante controladora do ciclo celular normal. As proteínas codificadas pelo gene *E7* degradam a pRb, promovendo a continuidade do ciclo celular e permitindo a replicação dos genes virais (Fig.5) [(Giarre *et al.*, 2001)].

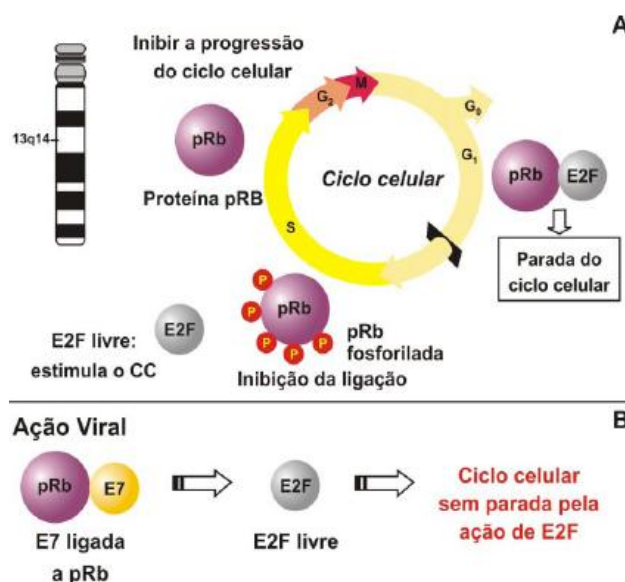


Figura 5. Esquema da interferência do gene *E7* no ciclo celular. (A) Associação da proteína pRb com o fator E2F e conseqüente regulação por inibição do ciclo celular. (B) Complexo E7pRb que resulta na liberação do fator E2F e proliferação exagerada das células (Fonte: Silva *et al*, 2003).

O gene *E7* também tem importante função de romper as atividades dos inibidores de CKIs (quinases dependentes de ciclinas), como a p16. A p16 é um inibidor da quinase ciclina dependente cuja expressão é negativamente controlada pelo produto do gene pRb. A proteína p16 é geralmente expressa em baixo nível em células normais enquanto é altamente expressa em células tumorais, em que a pRb é inativada pela E7. Logo, a superexpressão de p16 é um indicativo de infecção pelo HPV (Knebel, 2002; Dray *et al.*, 2005; Wentzensen *et al.*, 2005). Essa inativação auxilia, juntamente com a degradação da pRb, a impedir a interrupção do ciclo celular (Helt e Galloway, 2001).

2.4. Ciclo infeccioso e patogenia viral

Os tipos de HPVs mais frequentemente detectados em carcinomas de células escamosas são os tipos 16 e 18 (zur Hausen, 2006). Deve-se considerar que embora os níveis de infecção sejam elevados, relativamente em poucos casos há progressão maligna, já que em 95% dos casos o próprio organismo, provavelmente pela ação do sistema imunológico, consegue eliminar o vírus. A identificação de marcadores expressivos da progressão maligna requer compreensão mais ampla da frequência e história natural do processo infeccioso ligadas a cada tipo viral (Oliveira, 2006).

Os alvos da infecção pelo HPV são os queratinócitos indiferenciados da camada celular basal dos epitélios. A progressão da infecção viral depende da diferenciação do queratinócito (Campo, 2003; Ogawa *et al.*, 2004). A infecção pelo vírus se dá pela penetração inicial da partícula viral em células basais do epitélio cervical, em que os genes precoces são transcritos (Fig.6). Após o período inicial da infecção, os genes tardios iniciam seu processo traducional, seguido de multiplicação viral completa nas porções de tecidos superficiais do epitélio (Meschede *et al.*, 1998).

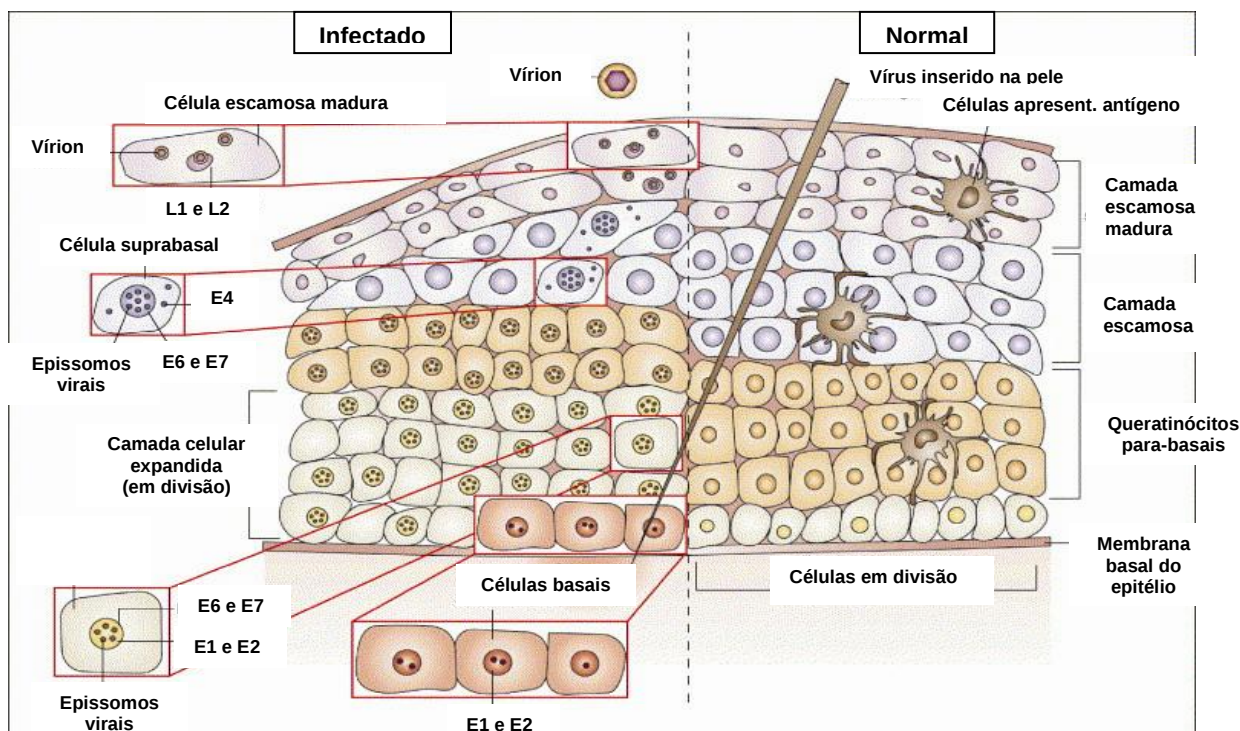


Figura 6. Ciclo replicativo do HPV (Adaptado de Meschede *et al.*, 1998).

A infecção do papilomavírus parece ocorrer através de microtraumas ocorridos na região epitelial, expondo as células basais à entrada do vírus. Após a junção do vírus à membrana da célula epitelial basal, ocorre a desintegração do capsídeo, com entrada do genoma viral no núcleo da célula hospedeira (Parkin e Bray, 2006).

Lehtinen *et al.* (2001) estudaram os estágios da infecção viral. Segundo os autores, primeiro ocorre um aumento da multiplicação do vírus requerido para o estabelecimento da infecção subclínica nas células basais cervicais. Com isso, há um estímulo das células de crescimento pela expressão e amplificação do gene viral com aparecimento das lesões intraepiteliais escamosas (SIL). Em seguida, ocorre imortalidade das células infectadas, resultando na persistência das lesões. Ocorrem modificações das funções celulares pelas oncoproteínas E6 e E7, podendo haver aumento de risco de infecção, não sendo um evento necessário para o desenvolvimento

do câncer cervical invasivo. E por fim, há instabilidade genômica com descontrole da expressão dos oncogenes virais, que eventualmente levam a progressão ao câncer e eventual metástase, se não houver tratamento adequado e a tempo.

Durante o processo infeccioso, ocorre uma ligação cooperativa entre E1 e E2, cujo papel é regular a transcrição dos genes virais e replicar o DNA. Nos estágios precoces da infecção viral, a proteína E2 reprime a transcrição dos oncogenes *E6* e *E7*, permitindo que o produto do gene *E1* se ligue à origem de replicação viral. A partir dessa ligação, o genoma viral passa a ser replicado como elemento extracromossomal na fase S do ciclo celular. O número de cópias do genoma é mantido constante nas células, e com um nível baixo de transcritos sendo expressos. Esta regulação negativa mediada por *E2* sob a transcrição de *E6* e *E7* permite que as proteínas p53 e pRb continuem atuando o que leva a continuação do processo de diferenciação celular normalmente (Villa, 1999; Szalmàs e Kònya, 2009). Em seguida, o produto do gene *E5* induz o aumento da atividade de uma proteína quinase mitogênica, que aumenta a resposta celular de proliferação e diferenciação. Simultaneamente, o produto do gene *E4* então promove maturação e liberação das partículas dos papilomavírus, uma vez que esta proteína leva ao colapso da rede de citoqueratina, que resulta no aspecto típico das células infectadas pelo HPV (Villa, 1999).

Os genes tardios *L1* e *L2* logo são ativados pelo promotor tardio, permitindo que as partículas virais sejam estruturadas no núcleo. A completa liberação dos virions ocorre na camada córnea do epitélio quando as células se desprendem durante o processo de descamação epitelial. Nas lesões não cancerosas o genoma do HPV é encontrado exclusivamente na forma de episômos. Porém, nos carcinomas cervicais, os genomas do HPV de alto risco são integrados no DNA da célula hospedeira (Fehrmann e Laimins, 2003).

A afinidade entre as proteínas derivadas dos genes supressores de tumores com as proteínas virais E6 e E7 determina o grau de oncogenicidade dos diferentes tipos de HPV, permitindo assim que alguns tipos de HPV sejam mais oncogênicos que outros. Os HPVs podem infectar células da camada basal tanto dos epitélios da pele quanto dos epitélios de mucosas que recobrem a boca, garganta, trato respiratório e trato anogenital (Fehrmann e Laimins, 2003).

Segundo zur Hausen (2000), a transmissão do HPV ocorre pelo contato direto, através de microlesões na pele. No caso da infecção genital, a transmissão se dá principalmente pelo contato genital durante a relação sexual. Por serem resistentes ao calor e a dessecação, também é possível que ocorra a transmissão não sexual, porém com incidência reduzida. Outros tipos de contato genital com ausência de penetração, incluindo o sexo oral, também têm sido descritos como vias de transmissão, entretanto são bastante raros. Além destas, existe ainda a transmissão genital de forma vertical (da mãe para o recém nascido).

A infecção genital pelo HPV pode resultar em verrugas anogenitais, que se localizam ao redor dos genitais e do ânus (HPV 6 e 11) e não levam ao câncer. Muitas delas são assintomáticas e podem ter uma resolução espontânea em 3 a 4 meses, caso contrário, podem permanecer na mucosa ou até aumentarem de tamanho e número. A infecção pode ser latente ou inativa, em que o indivíduo não apresenta sintomas aparentes da infecção. Acredita-se que neste caso de infecção, o DNA viral esteja sob a forma episomal, não funcional, e por isso não haja o aparecimento de lesões citológicas. E por último, a infecção pode ser do tipo ativa associada aos tipos de HPV de alto risco, responsáveis pelas alterações celulares que podem resultar em neoplasias intraepiteliais (Fehrmann e Laimins, 2003). Relacionado à infecção ativa, ela ainda pode ser clínica, quando existe presença das lesões, que podem ser vistas a olho nu na forma

de verrugas genitais ou condilomas; ou pode ser subclínica, quando as lesões não são visíveis, sendo necessário o diagnóstico através de peniscopia, colpocitologia (teste Papanicolau), e/ou colposcopia com biópsia. Por ser um diagnóstico indireto e interpretativo, a infecção subclínica pode resultar em diagnóstico falso-negativo e/ou falso-positivo (Fehrmann e Laimins, 2003).

2.5. Citologia viral

Existem diversos termos para classificar uma lesão encontrada. ASCUS (células escamosas atípicas de significância indeterminada) é definido por anormalidades celulares atribuídas a mudanças reativas menos quantitativamente e qualitativamente significantes que as lesões intraepiteliais. Em 1988, o Sistema Bethesda identificou SIL (lesões escamosas intraepiteliais), como um conceito geral das lesões de alto (H – *high*) e baixo (L – *low*) grau, por estarem ligadas de alguma forma citologicamente. Somente mais tarde é que os termos foram separados baseados em estudos mais discriminantes das lesões, classificando LSIL como sendo as lesões intraepiteliais de baixo grau, e HSIL as lesões intraepiteliais de alto grau. Histologicamente estas lesões puderam ser confirmadas com a utilização de outros termos, como CIN-1 (neoplasia intraepiteliais de grau 1), CIN-2 (neoplasia intraepiteliais de grau 2) e CIN-3 (neoplasia intraepiteliais de grau 3), sendo a primeira classificação correspondente a LSIL e as duas últimas correspondentes a HSIL (Kurman e Solomon, 1997; Máire e Duggan, 1999; Solomon *et al.*, 2002; Bergeron, 2003; Lin *et al.*, 2004; Solomon *et al.*, 2009; Wentzensen *et al.*, 2009). No entanto, existem diversas outras formas de classificar um mesmo tipo de lesão, segundo a Tabela 4.

Tabela 4. Equivalência de nomenclaturas citológicas e histológicas das lesões pré-invasivas de câncer cervical uterino. Em destaque a classificação de Bethesda (Adaptado de <http://www.cervical.com.br>; Kurman e Solomon, 1997).

Classificação citológica de Papanicolau	Classificação Internacional de Doenças (OMS – 1952-1973)	Classificação de Richard (1988)	Classificação citológica pelo Sistema Bethesda (2001)	Proposta de classificação histológica análoga ao Sistema Bethesda (Richard, 1990)
Classe I	-	-	Normal	-
Classe II	-	-	ASCUS/AGUS	-
-	Displasia leve	NIC I	LSIL	NIC de baixo grau
Classe III	Displasia moderada	NIC II	-	-
-	Displasia acentuada	NIC III	HSIL	NIC de alto grau
Classe IV	Carcinoma <i>in situ</i>	-	-	-
Classe V	Câncer	Câncer	Câncer	Câncer

NIC. Neoplasia intraepitelial cervical; LSIL. Lesão intraepitelial de baixo grau (*Low grade squamous intraepithelial lesion*); HSIL. Lesão intraepitelial de alto grau (*High grade squamous intraepithelial lesion*). O Sistema de Bethesda inclui ainda as categorias ASCUS (*atypical squamous cells of undetermined significance*) e AGUS (*atypical glandular cells of undetermined significance*), em situações em que existem atipias celulares, mas em grau insuficiente para permitir um diagnóstico de lesão intraepitelial.

O cérvix quando infectado pelo vírus HPV, torna a mulher HPV positivo. A persistência da infecção pode gerar a NIC-1 (neoplasia cervical intraepitelial amena ou *Squamous Intraepithelial lesion - SIL*), também designada, LSIL, sendo uma infecção mais branda. Progredindo a doença, aparece a NIC-2 e/ou NIC-3 (neoplasia cervical intraepitelial moderada e de alto grau, respectivamente), ou ainda HSIL, sendo infecções mais graves conhecidas como pré-câncer. Se ainda assim este não for tratado a tempo há progressão para o câncer invasivo e eventual metástase posterior (Fig7 e 8) [(Moscicki *et al.*, 2006; Bryan, 2007)].

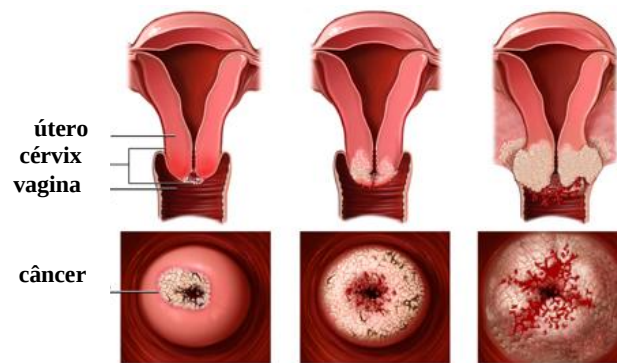


Figura 7. Evolução da lesão cervical pré-maligna ao câncer invasivo. Esquema do colo uterino com neoplasia intraepitelial cervical (Adaptado de NMA, 2007).

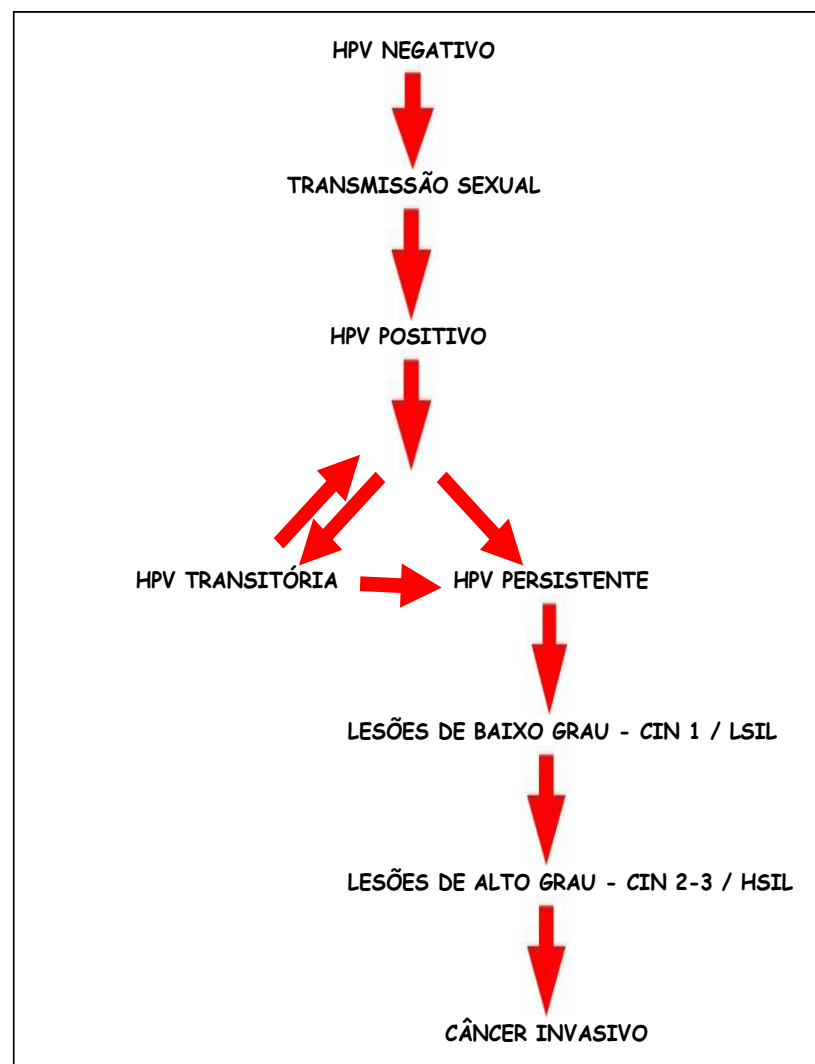


Figura 8. Modelo etiológico da infecção pelo HPV e câncer cervical (Adaptado de Franco *et al.*, 2001).

O tempo desde a infecção até a liberação dos virions é de aproximadamente três semanas, tempo requerido para o queratinócito basal passar pela diferenciação completa e descamação. O período entre a infecção e o aparecimento de lesões é altamente variável, podendo ser de semanas a meses (Oriel, 1971). Não há lise ou morte celular como consequência da replicação, montagem e liberação do HPV, devido ao ciclo natural do queratinócito até a descamação. Sendo assim, a infecção por HPV não é acompanhada de inflamação, e não há sinais óbvios para alertar o sistema imune da presença do vírus. Portanto, o ciclo infeccioso do HPV é por si só um mecanismo de evasão do sistema imune, inibindo a detecção do vírus pelo hospedeiro. Isso resulta em persistência e infecção crônica, e o hospedeiro pode ignorar o patógeno por longos períodos (Stanley *et al.*, 2006).

2.6. Co-fatores de infecção viral

Evidências clínicas e experimentais demonstram que o *background* genético e imunológico do hospedeiro tem um papel importante no estabelecimento e progressão da infecção por HPV (Wank e Thomssen, 1991; Apple *et al.*, 1994). Sendo assim, fatores genéticos virais e do hospedeiro são dados importantes para o risco de progressão do HPV à neoplasia entre indivíduos infectados.

Existem algumas causas de aquisição e persistência da infecção pelo HPV segundo estudos realizados por Trottier e Franco (2006). Relação sexual sem proteção, cigarro, contraceptivos orais, número de parceiros, doenças sexualmente transmissíveis em geral, sistema imunológico, condições imunossupressoras, incluindo a própria infecção pelo HPV são algumas delas (Wang *et al.*, 2009).

O sistema imunológico é um dos co-fatores de maior relevância quando se fala em infecção pelo HPV. Ele parece estar envolvido diretamente com o processo carcinogênico, já que existem diferenças no tempo de ativação do sistema imunológico ou na composição genética do hospedeiro. Sabe-se que não há uma exposição direta das oncoproteínas do HPV a células imunocompetentes logo, o desenvolvimento de anticorpos depende de uma infecção secundária por meio de pequenas lesões (Apple *et al.*, 1994).

O MHC representa o conjunto de genes responsável por codificar as moléculas de histocompatibilidade em uma determinada espécie. O MHC está ligado diretamente com a susceptibilidade à infecção.

Nos seres humanos este complexo é chamado de sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*) e codifica glicoproteínas de membrana especializadas na apresentação dos antígenos a diferentes subpopulações de linfócitos T (Wang e Hildesheim, 2003). Essas proteínas são codificadas por genes localizados no cromossomo 6, organizados em regiões de classe I (locos A, B e C) e classe II (regiões DR e DQ) e se caracterizam pelo alto grau de polimorfismo (Fig9) [(Nepom *et al.*, 1991; Donadi *et al.*, 2001; Alberts *et al.*, 2002)].

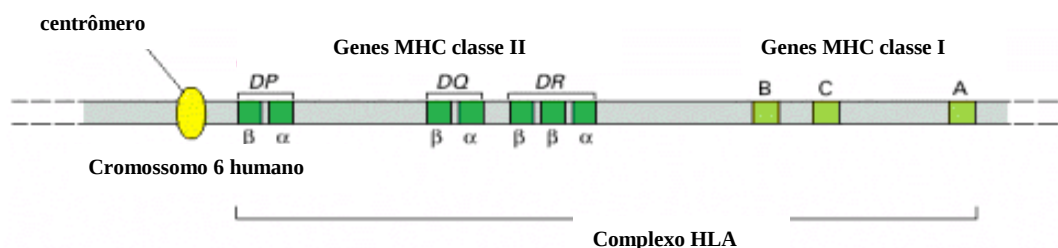


Figura 9. Esquema simplificado dos genes do MHC humano. DP, DQ e DR: *locus* dos genes de classe II HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR, respectivamente (Adaptado de Alberts *et al.*, 2002).

Os mecanismos de defesa envolvidos na regressão da infecção pelos HPVs envolvem a resposta imune mediada por células, sendo necessária uma apresentação adequada aos linfócitos, mediada pelas proteínas HLA. Falhas nesse processo podem ser responsáveis pela susceptibilidade ao HPV. Diversos estudos demonstraram associações entre os haplótipos HLA e a infecção pelo HPV. Maciag *et al.* (2002) encontrou entre os genes *Hla* classe II alguns haplótipos associados com a susceptibilidade à infecção pelo HPV.

Outro componente importante do sistema imunológico que parece estar relacionado com a infecção pelo HPV é a MBL (lectina ligante de manose). MBL é uma glicoproteína sintetizada no fígado e importante para o sistema imune inato, pela sua ligação a resíduos de manose ou a outros carboidratos componentes de vírus, de bactérias e de leveduras. A MBL ao ligar-se às estruturas de carboidratos intermedia a fagocitose por macrófagos e, quando associada à protease serina MASP, possui a capacidade de iniciar a ativação do sistema complemento pela via das lectinas, independente da presença de anticorpos (Roos *et al.*, 2001; Bierl *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2005; Gonçalves *et al.*, 2006).

A função da MBL está diretamente associada a sua concentração sérica, determinada pela interação entre mutações na região promotora e no éxon 1 do gene *Mbl*, as quais ocorrem nos códons 52, 54 e 57 (*Mbl**D, *Mbl**B e *Mbl**C, respectivamente) [(Madsen *et al.*, 1998; Guimarães *et al.*, 2008; Segat *et al.*, 2009)]. A ocorrência destas variantes tem sido associada à deficiência sérica da MBL e, conseqüentemente, à susceptibilidade à infecção pelo HPV [Alves *et al.* (2004); Guimarães *et al.* (2008); Segat *et al.* (2009)], demonstrando que os polimorfismos no gene *MBL2* podem ser responsáveis pela diferença inter-individual da resposta imune e explicar a susceptibilidade à infecção por HPV de alto risco com o câncer cervical.

Quanto ao gene *Tp53*, existe um polimorfismo no códon 72 e este está associado ao câncer cervical induzido pelo HPV. Neste códon podem ser codificados os aminoácidos arginina (Arg) e/ou prolina (Pro) [(Rau *et al.*, 2003)]. Logo, cada indivíduo herda um genótipo de *p53*, que pode ser heterozigoto (Arg/Pro) ou homozigoto ou para arginina (Arg/Arg) ou prolina (Pro/Pro). Este polimorfismo varia com a latitude, tipo celular, tipo de HPV, país e raça, e é mantido sob diferentes frequências de alelos na população (Sjalander *et al.*, 1995).

Storey *et al.* (1998) apresentaram resultados indicativos de que a *p53* (arginina) representa um significativo fator de risco no desenvolvimento do câncer pelo HPV. Foi demonstrado que mulheres homozigotas para arginina eram sete vezes mais susceptíveis ao carcinoma cervical que as heterozigotas arginina-prolina. Zehle *et al.* (1999) comprovaram que pacientes italianas e suíças homozigotas para arginina tinham maior risco para o carcinoma, comprovando a existência de alguma relação entre este polimorfismo e o HPV (Koushik *et al.*, 2006). Resultados semelhantes puderam ser observados em estudo recente de Koshiol *et al.* (2009).

A idade do indivíduo também é um fator relacionado à incidência de câncer cervical. Estudos mostram que as maiores prevalências são encontradas em mulheres abaixo dos 25 anos, com progressivo decréscimo linear após esta idade, alcançando valores inferiores a 5% após os 55 anos (Burk *et al.*, 1996; Franco *et al.*, 1999; Sanjose *et al.*, 2003; Baseman e Koutsky, 2005).

A explicação para a redução da incidência com a idade resultaria de mudanças nos hábitos sexuais, que tornariam as mulheres menos expostas. Entretanto, alguns estudos relatam queda na incidência da infecção por HPV com o avanço da idade mesmo em mulheres que mantêm contínua e intensa atividade sexual. Isto sugere que esta queda é

independente do comportamento sexual e parece estar relacionada mais ao sistema imunológico (Kjaer *et al.*, 2000).

No entanto, dados mais recentes comprovaram que a idade em relação à manifestação HPV segue um padrão de gráfico em forma de “U”, em que com os primeiros anos de atividade sexual, por volta dos 18 anos, há realmente um aumento da chance de infecção viral que declina com o avanço da idade, porém ocorre um pico logo após a menopausa, mais ou menos aos 55 anos. Este fato ocorre provavelmente por uma reativação da infecção latente e por uma queda gradual de eficiência do sistema imunológico (Rama *et al.*, 2008).

O tabagismo parece influenciar na incidência de câncer cervical através da interação entre as células do organismo e a nicotina e os demais produtos do cigarro. As células de Langerhans possuem papel importante de controle local contra infecção viral, pois sua função envolve apresentação do antígeno e estimulação da resposta imune mediada por linfócitos T. A nicotina e demais produtos afetam diretamente essas células, interferindo na habilidade do hospedeiro em ter uma resposta imune local efetiva contra infecções virais, pela redução no número e eficiência das células de Langerhans (Johnson *et al.*, 1990; Gram *et al.*, 1992; Haverkos *et al.*, 2000).

Um segundo mecanismo que explica a carcinogênese relacionada ao tabaco é a imunossupressão. Alterações verificadas no sistema imune periférico de pacientes fumantes com carcinoma invasivo causado pelo HPV incluem a elevação do número de células sangüíneas, o aumento do número de linfócitos T citotóxicos/supressores, a diminuição do número de linfócitos T indutor - auxiliar, discreta supressão da atividade de linfócitos T, significativo decréscimo da atividade de linfócitos *natural killer*, e baixos níveis sangüíneos de imunoglobulinas, exceto pela IgE, a qual é elevada (Johnson *et al.*, 1990). Indivíduos imunossuprimidos parecem estar ligados á

susceptibilidade ao processo carcinogênico, apresentando risco elevado para o desenvolvimento de neoplasia escamosa intraepitelial e invasiva do trato genital inferior. Dentre os indivíduos imunossuprimidos estão os que já fizeram transplantes de órgãos, que tiveram algum tipo de câncer de pele, que têm doença de Hodgkin ou estão infectadas pelo HIV, entre outros (Apple *et al.*, 1994).

Hormônios esteróides na forma de contraceptivos orais estão entre os co-fatores que podem levar à malignização viral, pois parecem aumentar a atividade transformadora dos oncogenes do HPV e interferir na resolução eficiente de lesões causadas pelo vírus na cérvix de mulheres jovens (Herrero *et al.*, 1990; Haverkos *et al.*, 2000). Diversos estudos epidemiológicos e clínicos também comprovaram que o uso de contraceptivos orais é um fator de risco no desenvolvimento do câncer cervical (Brinton *et al.*, 1989; Hildesheim *et al.*, 1990; Brisson *et al.*, 1994; Kjellberg *et al.*, 2000).

Com relação à alimentação foi verificado que a dieta de folato apresenta uma relação direta com a carcinogênese provocada pelo HPV. Uma redução na ingestão de folato tem sido amplamente associada a um risco significativo de aumento de carcinomas cervicais, porém sem dados conclusivos e definitivos de tal relação (Doorbar, 2006).

O consumo de samambaia (*Pteridium aquilinum*) encontrado em regiões tropicais e subtropicais também tem sido reportado como carcinogênicos quando ingeridos por bovinos e humanos (Stocco *et al.*, 1998). Os primeiros estudos com a samambaia iniciaram em 1988 (Moura *et al.*, 1988). Foi observado que animais consumidores desta planta apresentavam alterações citogenéticas significativas. Estas mudanças levavam a alterações celulares, as quais não eram eliminadas pelo organismo, pela descoberta da atividade imunossupressora da quercetina presente na samambaia.

Essas alterações celulares não sendo corrigidas, acabavam levando à progressão da infecção e aquisição de tumores.

Um estudo posterior demonstrou que existe uma transmissão vertical e horizontal de BPV em bovinos controlados experimentalmente, os quais tiveram dieta rica neste tipo de samambaia, havendo aumento no número de alterações cromossômicas (Stocco *et al.*, 1998). Lindsey *et al.* (2009) também descreveram anormalidades cromossômicas em linfócitos e sangue de animais infectados pelo BPV.

Alguns resultados recentes têm demonstrado uma relação intrínseca entre o consumo da samambaia e o processo infeccioso do HPV em indivíduos do Brasil (Recouso *et al.*, 2003), Japão (Hirayama, 1979; Shahin *et al.*, 1999) e Venezuela (Alonso-Amelot *et al.*, 2001). Foi observado ainda que a prevalência do HPV difere de acordo com as regiões e que o estudo destas diferenças é muito importante antes do estabelecimento de vacinas no mercado (Beçak *et al.*, 2009a).

A quercetina, componente presente nesta planta, já vem sendo estudada por outros pesquisadores como fator relevante no processo infeccioso, sendo descrita como altamente carcinogênica (Popp e Schimmer, 1991; Ferraz *et al.*, 2003; Souto *et al.* 2006).

Além dos comentados sistema MHC, gene *Tp53*, tabagismo, alimentação, idade do indivíduo, imunossupressão e contraceptivos orais, outros polimorfismos também parecem estar ligados à infecção e progressão para neoplasia do papilomavírus humano. Estes genes incluem o receptor de ácido retinóico (*RARA*), interleucina 10 (*IL10*), metilenetetraidrofolato redutase (*MTHFR*), *EVER1* e *EVER2* (*TMC6* e *TMC8*) e *WAF1* (*CDKN1A*) [Doorbar, 2006]. Os retinóides possuem efeitos anti-HPV via interação com fatores de transcrição nuclear. A desregulação dos receptores nucleares dos retinóides tem importante papel na transformação maligna celular (Cheah e Looi, 1998; Pfister, 2003). O polimorfismo no gene da interleucina 10 (*IL10*), peptídeo citosina responsável

pelos efeitos em inflamações e imunorregulações, pode resultar em aumento ou diminuição da produção de IL-10, afetando o desenvolvimento de câncer cervical. Estudos demonstraram que mulheres que produzem altos ou moderados níveis de IL-10 em comparação com mulheres que produzem baixos níveis, dependendo do polimorfismo genético podem apresentar maior risco de ter câncer cervical (Stanczuk *et al.*, 2001).

O gene da metilenetetraidrofolato redutase (*MTHFR*) sintetiza uma enzima que controla o metabolismo do folato e metionina e é conhecido por influenciar a síntese e reparo do DNA, além de ser conhecido como cofator genético responsável pela displasia cervical induzida pelo HPV. Estudos comprovaram que mutações no gene *MTHFR* estão associados com aumento do risco de displasia cervical (Koushik *et al.*, 2005).

Pesquisadores identificaram dois *loci* de susceptibilidade ao câncer cervical, conhecidos como *EVER1* e *EVER2* (ou *TMC6* e *TMC8*) no cromossomo 17. Foi proposto que as proteínas codificadas por estes *loci* são em parte responsáveis por controlar a infecção pelo HPV (Ramos *et al.*, 2002), porém ainda pouco se sabe sobre esta possível relação.

Harima *et al.* (2001) estudaram o polimorfismo do gene *WAF1*, um mediador induzido pelo p53 e inibidor da quinase dependente de ciclina. Eles descobriram que mutações no gene podem estar associadas ao desenvolvimento do câncer cervical.

2.7. Câncer cervical e vacinas profiláticas

Existem inúmeros testes para detecção do HPV e da doença causada pelo vírus. Um teste muito comum é a colpocitologia oncológica, também conhecido como teste Papanicolau. A infecção pelo HPV geralmente não apresenta sintomas, e o indivíduo

infectado talvez nunca saiba que ele esteja infectado ou tenha sido exposto ao HPV. No entanto, o teste Papanicolau é um importante exame que colabora para prevenir o câncer. Este teste pode detectar estágios de pré-câncer, conhecidos como displasia nas células do cérvix (Torpy *et al.*, 2007).

Testes mais especializados estão sendo usados para determinar HPV's de alto risco, sendo mais específicos e elaborados. Além do teste Papanicolau, existem ainda a colposcopia; o exame histológico, através de biópsia; e os testes moleculares como PCR (reação de cadeia em polimerase), *Southern blot*, captura híbrida, entre outros (Cuzick *et al.*, 2006).

Para aumentar ainda mais a eficiência na detecção e tratamento iniciou-se um grande estudo de vacinas profiláticas contra o HPV, além de estudos análogos para o desenvolvimento de vacinas em gado (BPV), cães e coelhos (Wood *et al.*, 2006).

Estudos realizados por Coimbra *et al.* (2007) demonstraram que infecções por papilomatoses induzem a respostas imunes tipo-específico, diretamente contra a proteína capsídica maior L1, construindo assim estratégias vacinais contra o BPV, através da expressão do gene L1 de HPV em sistema de expressão de *Pichia pastoris* como base na produção de vacinas VLPs (Góes *et al.*, 2008).

Estudos realizados com papilomavírus bovino vêm sendo desenvolvidos com sucesso. Beçak *et al.* (2009b) demonstraram a expressão em *E. coli* de BPV 1 L1. Para o desenvolvimento de uma vacina profilática contra o BPV 1 foi clonado o gene L1 de BPV 1 e expresso em *E. coli*. A detecção da expressão de L1 indicou que o modelo é apropriado e pode ser usado para o desenvolvimento de uma vacina contra o BPV.

Vacinas contra o HPV também estão sendo largamente investigadas. Segundo Inglis *et al.* (2006), as vacinas contra o HPV começaram a ser desenvolvidas por volta de 1993, com base nos estudos das proteínas de revestimento dos papilomavírus,

funcionando como instrumentos para a prevenção primária do câncer do colo. Com isso, pesquisadores puderam reunir dados suficientes para desenvolver as VLPs (partículas semelhantes a vírus) (Fig.10B;C).

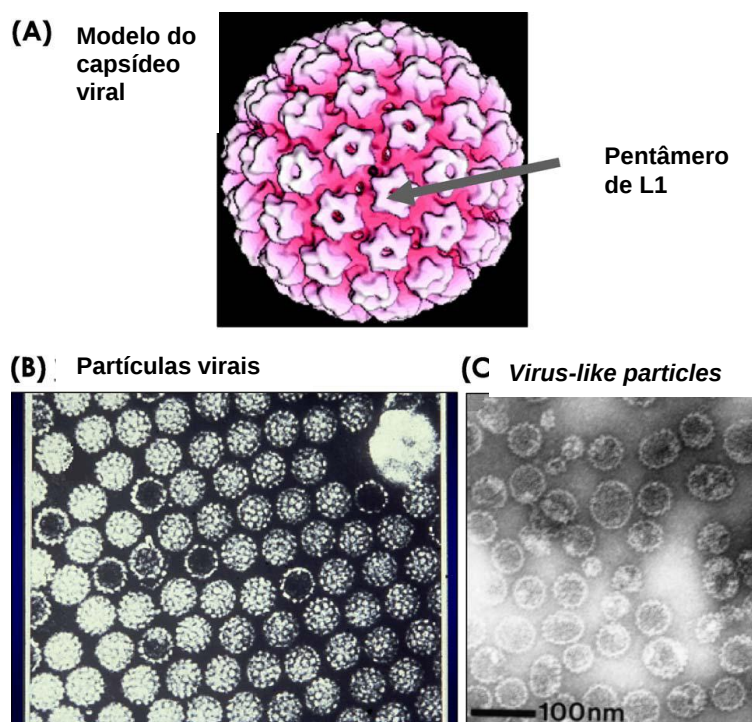


Figura 10. (A) Modelo do capsídeo do papilomavírus; (B) Partículas virais; (C) L1 virus-like particles (VLP) [Adaptado de Alberts *et al.*, 2002].

O início do desenvolvimento das vacinas não teve efeitos muito positivos. Não havia técnicas laboratoriais que permitissem obter partículas virais em cultura de tecidos e inexistiam modelos animais para a infecção. A maioria das vacinas contra vírus é baseada no uso de *virions* para induzir a produção de anticorpos, porém não se conseguia produzir *virions* de HPV (Tovar *et al.*, 2008; Massad *et al.*, 2009).

Somente mais tarde com a descoberta das proteínas L1 e L2 é que se conseguiu dar início à produção das vacinas contra o HPV, e também se obteve a produção das vacinas utilizando células de insetos, bactérias recombinantes e fungos (da Silva *et al.*,

2001; Lowy e Schiller, 2006). As VLPs podem ser obtidas pela superexpressão da proteína L1 sozinha, ou em co-expressão com a proteína L2 (Kirnbauer, 1996). As vacinas são produzidas por clonagem de genes virais de capsídeos de diferentes tipos de HPV em vetores, conseguindo-se produzir grandes quantidades de proteínas de capsídeos recombinantes, sendo posteriormente purificadas. A VLP tem estrutura similar ao vírus HPV, porém não é infecciosa e nem oncogênica, e representa, portanto, uma boa estratégia para o desenvolvimento de vacinas profiláticas. Estudos sugerem que as vacinas são eficazes em prevenir infecções e lesões citológicas associadas aos tipos de HPV, além do seu efeito profilático (Hildesheim *et al.*, 2006; Handisurya *et al.*, 2009).

As VLPs preservam os epítomos conformacionais necessários à indução de anticorpos neutralizantes e também são capazes de promover resposta celular (Dupuy *et al.*, 1999; Palker *et al.*, 2001; Coimbra *et al.*, 2007). Diversos estudos baseados em modelos animais mostraram que a imunidade humoral é um fator chave na prevenção da infecção por papilomavírus (Breitburd *et al.*, 1995; Kirnbauer, 1996; Wright *et al.*, 2006).

A eficiência das VLPs na indução da resposta imune e prevenção da infecção por papilomavírus foi primeiramente testada em modelos animais, como cachorro - COPV (Suzich *et al.*, 1995), coelho - CRPV (Breitburd *et al.*, 1995) e bovino - BPV-4 (Kirnbauer, 1996).

As vacinas contra a hepatite B foram as primeiras a serem produzidas contendo VLPs sintetizadas a partir de proteínas recombinantes em sistemas de expressão controlados (McAleer *et al.*, 1984). Outras doenças alvo para imunização com VLPs são gastroenterites (Tacket *et al.*, 2003), hepatite C (Lechmann *et al.*, 2001) e malária (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2000).

Em 8 de junho de 2006, a *US Food and Drug Administration* (FDA) aprovou a Gardasil[®], uma vacina quadrivalente desenvolvida pela *Merck Sharp & Dohme* contendo VLPs de *L1* dos tipos 6, 11, 16 e 18, para uso em mulheres de 9 a 26 anos de idade. Recentemente, a *GlaxoSmithKline* requereu à *European Medicine Agency* (EMA) uma licença para a vacina bivalente (denominada Cervarix) baseada em VLPs de *L1* de HPV 16 e 18 (Tabela 5) [(Tovar *et al.*, 2008)].

Tabela 05. Tipos de vacinas disponíveis no mercado (Adaptado de Tovar *et al.*, 2008).

Vacina	Tipo de HPV	Dosagem em semanas	População estudada	Triagem clínica
Bivalente	16 e 18	0, 1 e 6	Mulheres entre 15 e 25 anos	Infecção cervical
Quadrivalente	6, 11, 16 e 18	0, 2 e 6	Mulheres entre 16 e 25 anos	Pré-câncer ou lesões na vulva, vagina ou cérvix, assim como verrugas genitais e câncer cervical

Na imunidade humoral ou local, os anticorpos gerados em sua maioria, mas não todas, em indivíduos previamente infectados estão direcionadas a agir contra a epítopo conformacional no revestimento externo do vírus, de modo a neutralizá-lo, porém este tipo de defesa não tem sido eficaz contra todos os tipos de HPV e grau da doença. Logo, o desenvolvimento de novas vacinas é muito importante como uma forma preventiva e profilática de combate ao vírus (Stanley *et al.*, 2006).

A vacina contra o HPV, intensamente estudada, foi capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes tipo-específicos (IgG e IgA) [(Xu *et al.*, 2006)]. As VLPs podem induzir uma forte resposta de células *T-helper*, e, além disso, podem ativar células dendríticas (DCs) [Bontkes *et al.*, 2005]. As vacinas profiláticas contra o HPV são administradas intramuscularmente sendo necessárias mais de uma aplicação em

diferentes períodos. São vacinas ainda muito caras para distribuição, e tipo-específicas, não protegendo contra todos os tipos de HPVs e cânceres cervicais. Além disso, por serem profiláticas não protegem pacientes previamente infectados. Todos estes fatores geram discordâncias quanto a sua distribuição e utilização pela população (Schiller e Nardelli-Haeftlizer, 2006).

A vacinação disponível ainda pode provocar reações não esperadas, como possíveis reduções de práticas sexuais mais seguras, e levando a um conceito errado de que a vacina possa proteger contra outras doenças sexualmente transmissíveis, que não somente o HPV (Zimmerman, 2006). Os benefícios da vacinação incluem redução da infecção pelo HPV, redução do câncer cervical, possibilidade de redução da frequência de testes citológicos cervicais, e para a vacina que contém antígenos contra HPV 6 e 11, a diminuição de verrugas genitais. Outros benefícios são hipotéticos, porém incluem diminuição de outros cânceres e para a vacina que contém antígenos contra HPV 6 e 11, a diminuição de papilomas de laringe (Zimmerman, 2006).

Muitas questões devem ser resolvidas como segurança em longo prazo para a eficácia da vacinação, eficácia contra tipos de HPV não incluídos na vacina, eficácia da vacina em pessoas imunocomprometidas, e eficácia em homens, antes do seu uso em larga escala (Hildesheim *et al.*, 2006).

Além da vacinação profilática estão sendo desenvolvidos estudos sobre vacinação terapêutica, ou seja, vacinas quiméricas construídas com epítopos antigênicos da oncoproteína E7 juntamente com a proteína L1, com a geração de VLPs. Este sistema de produção gera um efeito preventivo e terapêutico, com uma resposta imune contra oncoproteínas E7 em modelos animais (zur Hausen, 2002). Duas destas vacinas estão sendo desenvolvidas pela *Xenova Research*, a TA-CIN, sendo a fusão protéica viral de L2/E6/E7; e a TA-HPV originando uma vacina codificante de oncoproteínas E6

e E7 do HPV 16 e 18 modificadas. A primeira mostra resposta a células T em estudos pré-clínicos em modelos animais, e a última apresenta imunogenicidade em pacientes com câncer cervical avançado, em estágio inicial e neoplasia intraepitelial cervical de alto grau (van der Bung *et al.*, 2001).

2.8. Incidência de câncer no Brasil e no mundo

Os estudos da relação entre o HPV e o câncer foram iniciados nos anos 90 e continuam sendo uma das principais preocupações da Organização Mundial da Saúde, em particular nos países em desenvolvimento (Ferenczy e Franco, 2002; Brenna e Syrajanen, 2003; Muñoz *et al.*, 2003).

O câncer cervical é a segunda mais comum neoplasia maligna que afeta mulheres em todo mundo, compreendendo aproximadamente 10% de todos os cânceres (excluindo os cânceres de pele) [Ferlay *et al.*, 2001]. Aproximadamente 500.000 mulheres desenvolvem câncer cervical anualmente no mundo. Estudos revelam que cerca de 10 entre 100.000 e 40 entre 100.000 mulheres desenvolvem câncer cervical por ano em países desenvolvidos e em desenvolvimento, respectivamente. Ou seja, 4 de 5 novos casos ocorrem em países subdesenvolvidos (Ferenczy e Franco, 2002; Burd, 2003; Brenna e Syrajanen, 2003; Roden e Wu, 2004).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de colo de útero é a infecção pelo HPV. O *International Biological Study on Cervical Cancer* demonstrou em 1995 uma análise estatística realizada em 22 países que registraram que o HPV esteve associado ao câncer de colo uterino em 75 a 100% dos casos, com média de 92,9% (Whelan *et al.*, 1991; Bosch *et al.*, 1995; Parkin *et al.*, 1997). Ho *et al.* (1998) observou um aumento da infecção pelo

HPV associado à baixa idade feminina, etnia hispânica, raça negra, e em um grande número de parceiros sexuais.

Segundo Wright *et al.* (2006), mais de 120 tipos de HPVs tem sido caracterizados molecularmente desde o início de seu estudo, dos quais mais de 40 são considerados tipos genitais por infectarem preferencialmente o epitélio escamoso estratificado da mucosa e camada vaginal do cérvix, vagina, vulva, pênis e área perianal.

Na América do Sul, o Brasil é o país que apresenta a maior incidência de casos de câncer cervical, sendo responsável por 50% dos 49.025 casos registrados no ano 2000. De acordo com o Ministério da Saúde/INCA (2007), os Estados de Mato Grosso, Goiás e Mato Grosso do Sul lideram as estatísticas; Pernambuco está em sexto lugar, sendo responsável por 15% dos novos casos, dos quais se estima 9,6% de óbitos. Entretanto, o Estado de Pernambuco lidera as estatísticas de incidência de câncer cervical na Região Nordeste, que corresponde a 15% da incidência de todos os tipos de câncer no Estado, após apenas ao câncer de mama.

Com base nas taxas atuais de câncer cervical, e considerando mudanças demográficas, o número de casos novos esperados no Brasil aumentará de 19.603 estimado para o ano de 2002, para aproximadamente 36.800 no ano de 2030 (Ferlay *et al.*, 2004; WHO, 2007). A cidade do Recife, capital de Pernambuco, tem uma incidência muito alta de câncer cervical (83,2 por 100.000 mulheres), sendo a maior taxa relatada no mundo (INCA, 2007).

O HPV 16 é o mais prevalente em diversos países estudados. O Brasil não apresenta dados estatísticos claros de prevalência da infecção pelo papilomavírus humano na população sexualmente ativa de diversos estados e regiões, nem dados demonstrativos sobre a vacinação. Porém, alguns dados confirmam que o HPV 16

continua sendo o mais prevalente em todas as regiões, no entanto, o HPV 18, segundo mais prevalente em quase todos os países, no Brasil não apresenta essa uniformidade, sendo mais prevalente no Norte, Sudeste e Sul. Na região Central e Nordeste o segundo HPV mais comum é o HPV 31 [Tabela 6] (Cavalcanti *et al.*, 1994; Eluf-Neto *et al.*, 1994; Bosch *et al.*, 1995; Gonçalves *et al.*, 1999; Noronha *et al.*, 1999; Lorenzato *et al.*, 2000; Rabelo-Santos *et al.*, 2003).

Tabela 6. Distribuição dos genótipos mais incidentes nas diferentes regiões brasileiras (Adaptado de Rosenblatt *et al.*, 2005).

HPV	Região Norte	Região Nordeste	Região Central	Região Sudeste	Região Sul
16	43,5%	59,3%	57,1%	53,8%	52,2%
18	8,2%	5,1%	5,4%	8,6%	8,7%
31	-	11,9%	1,8%	1,6%	4,3%
33	-	5,1%	8,9%	1,6%	-

Os espaços com símbolo (-) significam que não foram testados para os respectivos tipos virais.

Vários estudos de câncer cervical foram recentemente realizados nas regiões sul e sudeste do Brasil. Estes estudos relacionaram as anormalidades cito e histológicas presentes em amostras cervicais, a infecção pelo HPV e os fatores que ocasionam essas anormalidades (Derchan *et al.*, 2008; Rama *et al.*, 2008).

Estudos com a população de Natal, Rio Grande do Norte (Fernandes *et al.*, 2009) e de Recife, Pernambuco (Lorenzato, 2000; Mendonça *et al.*, 2008), demonstraram a prevalência de infecção pelo HPV em mulheres que apresentavam atividade sexual e que neste contexto havia uma prevalência muito maior de infecções pelos tipos virais 31 e 33 em relação às mulheres da região sul e sudeste.

O HPV 33 é relatado como sendo filogeneticamente próximo ao HPV 16 (de Villiers *et al.*, 2004). Em uma recente meta-análise o HPV 33 foi considerado o quarto

mais freqüente genótipo em amostras de câncer invasivo na América do Norte (Clifford *et al.*, 2003). Em mulheres sexualmente ativas com risco para infecção ou já infectadas pelo HPV, o polimorfismo HPV 33 na região *LCR* foi associada com a persistência da infecção pelo papilomavírus humano (Gagnon *et al.*, 2004). No entanto, por causa da alta proporção de infecção por múltiplos tipos de HPVs naquele estudo, foi impossível investigar o impacto do polimorfismo do HPV 33 na grade de doenças cervicais.

Foi verificado que o HPV 16 apresentava relação com a etnia em populações do Canadá e Brasil, diferentemente do encontrado em HPV 33. No entanto, o HPV 33 apresentava diferentes variantes entre esses dois países, em amostras de câncer cervical invasivo, devido a alterações em *L1* e *E6*. Estes estudos podem explicar as diferenças de incidência dos tipos virais nas diversas regiões brasileiras (Stewart *et al.*, 1996; Xin *et al.*, 2001).

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Este trabalho objetivou determinar os tipos mais prevalentes de papilomavírus humano causador de câncer cervical da região metropolitana do Recife, Pernambuco, sua relação com tipo de lesão, buscando discutir o uso das vacinas profiláticas disponíveis no mercado para a região.

3.2. Objetivos Específicos

1. estabelecer os tipos de HPV mais freqüentes em Recife, PE;
2. avaliar a prevalência dos HPVs 16, 18, 31 e 33 por meio de técnicas moleculares;
3. avaliar clínica e randomicamente os tipos de lesões mais freqüentemente encontradas;
4. relacionar os tipos virais de HPVs com os tipos de lesões encontradas;
5. relacionar os locais das extrações das lesões com os tipos virais estudados;
6. discutir a relação dos tipos virais mais prevalentes em Recife com as vacinas profiláticas disponíveis no mercado.

4. Material e Métodos

4.1. Material

Neste trabalho foram avaliadas 863 amostras de 617 mulheres quanto à presença e ao tipo de HPV, assim como tipo e grau de lesão, através do método de análise molecular (PCR), além de análises citológicas. As amostras para produção dos controles positivos C+H16, C+H18, C+H31 e C+H33 foram cedidas gentilmente pelo Laboratório de Genética de Microrganismos, da Universidade Federal de Pernambuco (Recife - Pe), e também pelo Laboratório de Genética, do Instituto Butantan (São Paulo - SP).

Para clonagem do gene *L1* no vetor pGEM-T *Easy* foram utilizadas enzimas e kits da Promega Corporation (Madison, USA) – enzima *Xho* I; T4 DNA ligase; kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*; kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purifications System* – e também da Invitrogen Corporation (Califórnia, EUA): *Xgal*; IPTG; RNase; dNTPs; *Taq* DNA Polimerase, marcador Lambda *Hind* III e Marcador *plus* de 1 Kb; kit *Purification and Quantification PureLink*.

A enzima de restrição *Bst* BI foi adquirida da New England BioLabs Inc. (EUA) e a enzima *Triple Master* DNA polimerase para amplificação do gene *L1* de HPV 18 foi adquirida da Eppendorf (EUA).

Para extração de DNA foram utilizados *ependorffs* de 1,5mL estéreis, isopropanol (temperatura ambiente), etanol 70 % (temperatura ambiente) e banho-maria à 65°C (para rápida reidratação do DNA).

Os seguintes equipamentos foram utilizados: microcentrífuga, banho-maria, estufa, termociclador, fonte para eletroforese, transiluminador e câmara de fluxo laminar. Os seguintes compostos foram utilizados durante o desenvolvimento do

trabalho: brometo de etídeo; Tris-Base; ácido acético glacial; EDTA; glicerol; azul de bromofenol; ágar bacteriológico; CaCl₂; ampicilina; Zeocina™; extrato de levedura; triptona; Tris-HCl; glicose; NaOH; SDS; e acetato de potássio.

4.2. Métodos

4.2.1. Grupo controle negativo

O grupo controle negativo foi formado por 48 mulheres saudáveis, HPV negativo, genotipadas pela nossa equipe juntamente com as amostras positivas. As amostras foram cedidas pelo Hospital Materno Infantil Professor Fernando Figueira (IMIP), a partir de mulheres que estavam em tratamento de rotina.

4.2.2. Grupo controle para confirmação do funcionamento dos primers e amostras tipo-específicas

Para um bom funcionamento do experimento as amostras de HPV 16, 18, 31 e 33 foram manipuladas adequadamente, para a produção dos controles positivos, e também para comprovar que os *primers* utilizados neste trabalho estavam em perfeito funcionamento, assim como padronização da PCR.

Os controles dos HPV 16 e 18 foram produzidos a partir de vetores pBR322 (pBR322HPV16 e pBR322HPV18). Os controles CH16 e CH18 foram cedidos gentilmente pelo Laboratório de Genética de Microrganismos, da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

As amostras de HPV 16 e 18, ao chegarem ao nosso laboratório já se apresentavam clonadas em pBR322. Logo, pBR322H16 e pBR322H18 foram usados como template de nossa reação para amplificação do gene *L1* de HPV 16 e HPV 18 com a enzima *Taq DNA polimerase* comum. Após esta etapa, o material foi purificado, seguindo as instruções do protocolo sugerido pelo *kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Este processo serve para retirar todos os restos de material que possa ter ficado na PCR como, por exemplo, *primers* e tampões, que pudessem interferir na ligação do vetor pGEM.

Foi realizada, então, a partir a ligação dos vetores L1H16 e L1H18 com o vetor pGEM-T *Easy* (Promega) na proporção de 3:1 (vetor:inserto, respectivamente), e a partir daí foi realizada a transformação bacteriana com as construções pGEML1H16 e pGEML1H18 para verificar a presença de recombinantes vetor:inserto. Este procedimento pôde ser comprovado através da extração plasmidial e também das digestões. As enzimas utilizadas foram a *EcoRI* (10 unidades/ μ L, temperatura ótima 37°C, Promega), a *Xho I* (10 unidades/ μ L, temperatura ótima 37°C, Promega); a *Bst BI* (20 unidades/ μ L, temperatura ótima 65°C, New England BioLabs), e a *KpnI* (10 unidades/ μ L, temperatura ótima 37°C, Promega).

Já os controles CH31 e CH33 foram produzidos a partir de amostras clínicas de HPV 31 e HPV 33, respectivamente, cedidas pelo Instituto Butantan (SP). O controle CH33 foi feito por alunos de mestrado do Laboratório de Genética de Microrganismos, da Universidade Federal de Pernambuco, enquanto a amostra clínica de HPV 31 foi manipulada posteriormente, durante o presente experimento, porém seguindo o mesmo procedimento da amostra HPV 33.

4.2.2.1. Amplificação da amostra clínica HPV 31 para posterior clonagem

O DNA da amostra clínica de HPV 31 foi submetido antes do processo de amplificação, à 42°C por 10 minutos e depois a um choque térmico em gelo, misturando bem para que o material pudesse estar em perfeitas condições de uso.

A amplificação do material foi realizada com enzima de alta fidelidade. A reação de amplificação foi feita utilizando-se de 5µL da amostra, 0,6µM de cada *primer* (primers FL1H31 e RL1H31, que amplificam toda a região L1 viral), tampão 10X (Eppendorf), 0,2mM dNTP, 2mM MgSO₄, 1U TaqHiFi (enzima *Triple Master* - Eppendorf - DNA polimerase - *Taq DNA Polymerase High Fidelity*, ou seja, *Taq* de alta fidelidade), para um volume total de 50µL.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador com os devidos ajustes de temperaturas e ciclos: 30 ciclos de amplificação (94°C por 20 segundos, 55°C por 20 segundos, 68°C por 1 minuto 30 segundos, com extensão final de 68°C por 5 minutos). O produto de PCR foi analisado através de eletroforese (gel de agarose 0,8% em tampão TAE a 100V por 30 minutos). Para esta reação foi utilizado também o controle negativo para verificação de eventual contaminação.

4.2.2.2. Clonagem do gene L1H31 em vetor pGEM-T *Easy* (ligação do inserto no vetor)

O gene L1H31 foi usado em uma reação de ligação ao vetor pGEM-T *Easy*. O produto da amplificação foi colocado no *speed vac* para secagem da amostra, deixando apenas um *pellet*. Posteriormente foi adicionado 5µL de água miliQ, fazendo com que a concentração da amostra analisada diminuísse, para que pudesse ser realizada clonagem. Após a realização da secagem do material no *speed vac* foi realizada uma reação na

proporção de 3:1, com 7ng/μL do produto da PCR, 5ng/μL de pGEM-T *Easy* tampão 1X, 0,3U T4 ligase, num volume total de 10μL. A reação foi colocada em tubo de microcentrífuga, deixando *overnight* a 15°C.

4.2.2.3. Transformação bacteriana e extração plasmidial de pGEM1H31 em *Escherichia coli* Top10

O processo de transformação foi realizado na câmara de fluxo, adicionando para cada placa 15μL de pGEM1H31, 25μL de tampão de transformação e 50μL de *E. coli* Top10 competentes. Esta solução foi incubada em gelo e água por 30 min, com posterior choque térmico em banho-maria a 42°C por 5 min, no gelo por 1 min. Logo após esta etapa, o material foi colocado a 45°C por 1 hora, e então plaqueadas por espalhamento em placa contendo meio sólido de LB, ágar e ampicilina (25mg/mL). Na placa também foi adicionado X-Gal (80μg/mL) e IPTG (0,5mM).

Após o crescimento, o material foi utilizado para fazer a extração plasmidial. Para este processo foi utilizado o kit *Wizard Plus sv minipreps DNA purification system*. Também foi feita a digestão do plasmídeo com enzima *SfuI* (NE), com incubação em banho-maria a 65°C por 3 horas (2μL do produto da extração, 5U *SfuI*, tampão 1X, num volume total de 20μL). Os resultados foram analisados em gel de agarose 0,8% TAE1X.

4.2.3. Grupo controle positivo

As amostras cedidas pelo Laboratório de Genética do Instituto Butantan (SP) foram devidamente manipuladas para que pudessem ser produzidos os controles positivos.

Por já terem sido comprovadas pelas técnicas laboratoriais anteriores de se tratarem de amostras de HPV 16, 18, 31 e 33, elas foram utilizadas como controles positivos das reações. Para os controles C+H16 e C+H18 foram utilizadas as amostras pBR322H16 e pBR322H18, e para os controles C+H31 e C+H33 foram utilizadas as amostras clínicas HPV 31 e HPV 33.

4.2.3. Grupo de estudo

O Hospital Materno Infantil Professor Fernando Figueira (IMIP) direcionou pacientes de sexo feminino que estavam sendo atendidas dentro de sua rotina, para análise referente à detecção e tipificação viral. A mesma equipe médica que realizou a triagem das pacientes realizou das coletas das amostras, sendo para cada paciente duas amostras de esfregaço de colo de útero, coletadas de forma padronizada para tipificação viral.

Foram analisadas 863 amostras de 617 mulheres, com idade média de 23 anos (intervalo de 18-35, intervalo interquartil 20-27). As pacientes admitidas para este estudo estavam em tratamento por um período de 3 ou mais anos. Todas as pacientes selecionadas residem na região metropolitana de Recife, Pernambuco, Brasil, e a importância do estudo foi explicada às pacientes, que manifestaram seu consentimento por escrito. O estudo foi, também, aprovado pelo Comitê de Ética do IMIP.

4.2.3.1. Extração do DNA genômico das amostras dos pacientes

Após a realização da raspagem com *cytobrush* da região da lesão, a mesma foi estocada em Tris-HCL 10mM para a extração do DNA genômico viral utilizando-se o

GenomicPrep Blood DNA isolation kit (Amersham Bioscience) de acordo com as instruções do fabricante.

O procedimento foi realizado colocando-se em um *ependorff* 300µL da amostra e acrescentando 900µL de *Cell Lysis Solution*, invertendo o tubo de 5 a 6 vezes para homogeneizar o material. Depois deste passo, a solução foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos, invertendo de 2 ou 3 vezes o tubo durante esse período. Centrifugou-se então, o material a 13000 ou 16000g por 20 segundos, descartando o sobrenadante sem tocar no *pellet*; que foi homogeneizado. Após esta etapa adicionou-se 300µL de *Nuclei Lysis Solution*, pipetando a solução 5 a 6 vezes para lisar as células. Foram adicionados 100µL de *Protein Precipitation Solution*, em agitação por 20 segundos. Após este período, centrifugou-se o material a 13000 ou 16000 g por 3 minutos, transferindo o sobrenadante para um *ependorff* novo contendo 300 µL de isopropanol. Misturou-se a solução por inversão, e novamente centrifugou-se o material a 13000 ou 16000 g por 1 minuto. Em seguida foi adicionado 300µL de etanol 70%, invertendo o tubo para lavar o *pellet* de DNA e novamente centrifugou-se a solução a 13000 ou 16000 g por 1 minuto. O etanol foi então aspirado. Ao término, o tubo foi invertido em papel toalha para secar o *pellet* por 10 a 15 minutos, e posteriormente, foi adicionado 100 ou 50 µL de *DNA Rehydratation Solution*, incubando o material a 65°C por 1 hora, ou incubando *overnight* a 4°C.

4.2.3.2. Amplificação do DNA viral para detecção viral

A detecção do DNA do papilomavírus humano foi realizada pela técnica da PCR convencional. Esta metodologia baseia-se na amplificação do gene codificador da L1 usando *primers* consenso e degenerados (MY09/MY11) para uma ampla faixa dos

diferentes tipos de HPVs na região do gene viral L1 (Kay *et al.*, 2002). A amplificação do gene da β -globina humana foi realizada para averiguar a qualidade da extração do DNA e evitar possíveis resultados falso positivo, utilizando-se *primers* PC04 e GH20, capazes de amplificar um fragmento do gene da β -globina humana (tabela 7). Em todos os ensaios foram empregados controles positivos e negativos (água).

Tabela 7. *Primers* e seqüências dos oligonucleotídeos utilizados na detecção do papilomavírus humano (Adaptado de Karlsen *et al.*, 1996).

<i>Primer</i>	Seqüência dos oligonucleotídeos	Tamanho em pares de bases	
		Oligo	Fragmento
MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC	20	445-499
MY11	GCMCAGGGWCATAAYAATGG	20	445-499
PC04	CAACTTCATCCACGTTCCACC	20	268
GH20	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	20	268

A PCR empregada na detecção do HPV foi desenhada utilizando os *primers* MY e da β -globina, de forma que para cada paciente foram realizadas duas PCRs idênticas corridas em paralelo, sendo uma específica para o HPV e outra para a globina. As condições gerais da PCR, como concentração dos componentes e etapas da ciclagem, foram testadas previamente.

Como controle positivo da reação foi utilizado o plasmídeo do HPV 16, 18, 31 e 33, clonado. O controle negativo nas eletroforeses foi realizado com amostras sem DNA viral.

A reação foi efetuada acrescentando-se a 5 μ L de cada amostra do DNA a ser testado; 1,6 μ M de cada *primer* (2 μ L de cada primer); 12,5 μ L de Master mix; 3,5 μ L de água bidestilada; em um volume total de 25 μ L. A mistura foi, em seguida, submetida a 95°C por 1 minuto para desnaturação do material, com 34 ciclos de amplificação (94°C

por 30 segundos, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto), e ao final por 10 minutos a 72°C. Após eletroforese em gel de agarose a 2%, os produtos da PCR foram corados em solução de brometo de etídeo e visualizados à luz ultravioleta.

4.2.3.3. Amplificação do DNA viral para tipificação viral

Com base nos genomas completos do HPV 16, 18, 31 e 33 depositados no *GenBank*, os oligonucleotídeos específicos foram desenhados de acordo com o artigo publicado de Karlsen *et al.* (1996) (tabela 8). Os *primers* específicos para os HPVs 16, 18, 31 e 33 amplificam os genes *E6* e *E7*.

Tabela 8. *Primers* e seqüências dos oligonucleotídeos utilizados na tipificação do papilomavírus humano (Adaptado de Karlsen *et al.*, 1996).

Tipo	Primer	Seqüência do Primer	Posição	Número de pares de bases
HPV 16	Pr1	5'TCA AAA GCC ACT GTG TCC TGA 3'	421-440	119
	Pr2	5'CGT GTT CTT GAT GAT CTG CAA 3'	521-540	
HPV 18	Pr1	5'CCG AGC ACG ACA GGA ACG ACT 3'	533-553	172
	Pr2	5'TCG TTT TCT TCC TCT GAG TCG CTT 3'	682-706	
HPV 31	Pr1	5'CTA CAG TAA GCA TTG TGC TAT GC 3'	3835-3875	153
	Pr2	5'ACG TAA TGG AGA GGT TGC AAT AAC CC 3'	3963-3988	
HPV 33	Pr1	5'AAC GCC ATG AGA GGA CAC AAG 3'	567-587	211
	Pr2	5'ACA CAT AAA CGA ACT GTG GTG 3'	758-778	

As reações de amplificação foram realizadas com *primers* específicos para os HPVs 16, 18, 31 e 33 (Karlsen *et al.*, 1996). Para isso, foram efetuadas reações de volume total de 20µL, contendo 4µL de DNA; 0,4µM de cada *primer* específico (0,8µL de cada *primer*); 10µL de Master mix e 4,4µL de água bidestilada, sendo realizadas reações separadas para os diferentes tipos de *primers* específicos para os HPVs 16, 18, 31 e 33. A reação foi submetida a 94°C por 5 minutos, com 35 ciclos de amplificação

(95°C por 30 segundos; 57°C para HPV16 e 18 e 55°C para HPV31 e 33, ambos por 30 segundos; 72°C por 1 minuto), seguidos ao final por 10 minutos a 72°C. Após a amplificação foi feita eletroforese em gel de agarose a 2,5%, corados com brometo para posterior visualização.

4.2.3.4. Análise citológica cérvico-vaginal randômica das lesões

Associado aos dados de detecção e tipificação viral das pacientes foi feito a análise randômica citológica cérvico-vaginal dos vários tipos de lesões observadas em 123 das 617 mulheres do grupo de estudo, para possível relação posterior com tipo e incidência viral das amostras analisadas.

O exame citológico cérvico-vaginal das lesões foi realizado através da coleta do material de diferentes regiões do aparelho reprodutor feminino. O material foi coletado com o auxílio da espátula *cytobrush* e feito o esfregaço em lâminas de vidro, fixados com etanol 95% e corado pelo método Papanicolaou. As análises citológicas foram realizadas pela aluna de mestrado do LIKA, Letícia Kartz, na Universidade Federal de Pernambuco, e cedidas gentilmente para a complementação do projeto em questão. O método de classificação utilizado para as análises foi feito baseado na classificação Bethesda de 2001 (Bergeron, 2003).

4.2.3.5. Análise dos locais das lesões

Como as lesões foram coletadas de diferentes locais do aparelho reprodutor feminino foi também investigada uma eventual relação entre os locais dessas lesões das pacientes com os tipos virais estudados.

5. Resultados

5.1. Amplificação da amostra clínica HPV31 para posterior clonagem

O resultado demonstrou que houve amplificação do material de HPV 31, com a enzima de alta fidelidade, apresentando um fragmento de 1,5Kb (quilobases), como demonstrado na Figura 11.

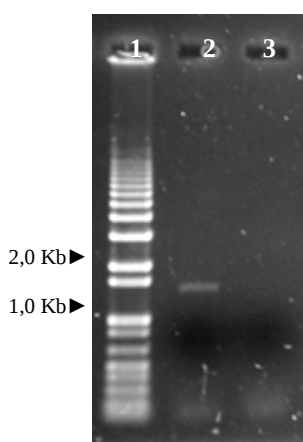


Figura 11. Amplificação da amostra clínica de HPV 31 com enzima de alta fidelidade. 1 – marcador de 1Kb; 2 – genoma HPV 31 (1,5 Kb); 3 – controle negativo.

5.2. Clonagem do gene L1H31 em vetor pGEM-T Easy (ligação do inserto no vetor)

Analizando o gel de agarose acima, constatou-se que havia aproximadamente 20ng de DNA. Logo, após a realização da secagem do material no *speed vac* obteve-se 70ng/μL de material. Foi então realizada uma reação na proporção de 3:1, com 7ng/μL do produto da PCR e o resultado só foi possível de ser observado após a realização da transformação bacteriana.

5.3. Transformação bacteriana e extração plasmidial de pGEML1H31 em *Escherichia coli* Top10

O resultado do processo de transformação bacteriana demonstrou o aparecimento de uma única colônia, a qual foi repicada em nova placa, deixada na estufa *overnight* e a partir deste crescimento foi feito inóculo do preservado obtido, deixando-o em 20mL de meio LB e 80μL de ampicilina no *shaker* por 16 horas. Um bom crescimento do material foi obtido que pôde ser utilizado para fazer a extração plasmidial.

Os resultados foram analisados em gel de agarose 0,8% TAE1X, observados na figura 12, apresentando extração com fragmento de 3Kb e digestão do plasmídeo de 4,5Kb, com enzima *SfuI* (NE).

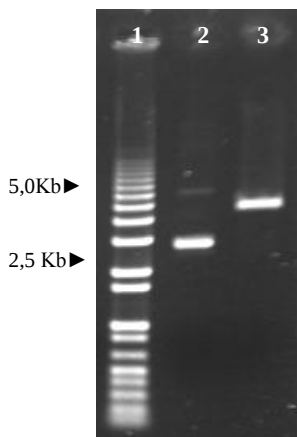


Figura 12. Extração e digestão plasmidial de pGEML1H31. 1 – marcador lambda *Hind* III, 2 – extração do vetor linearizado (3Kb), 3 – digestão do plasmídeo H31 (4,5Kb).

5.4. Detecção viral das amostras do grupo de estudo

A detecção viral foi feita a partir dos *primers* genéricos MY09/MY11 (amplificação da região *L1* do genoma viral de 450pb) de 617 mulheres, obtendo-se 64,18% de amostras positivas e 35,82% de amostras negativas (tabela 9). Para este teste foi realizada a amplificação também com *primers* para β -globina (PC04 e GH20 de 256pb), como demonstrado na figura 13.

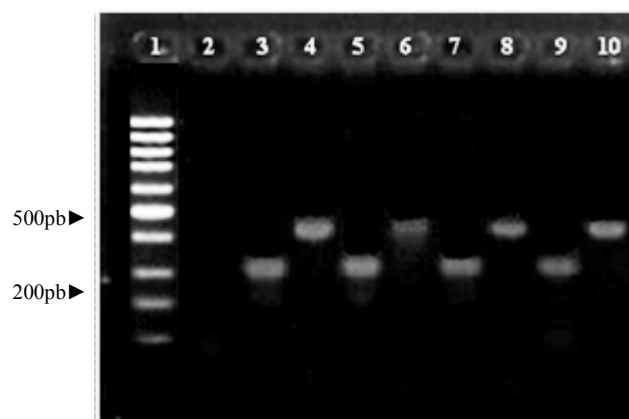


Figura 13. Detecção em algumas mulheres com uso de *primers* genéricos MY09/MY11 para a região *L1* e *primers* PC04/GH20 para β -globina. 1- marcador 100pb; 2 – controle negativo; 3 – amostra 47 *primer* globina; 4 – amostra 47 *primer* HPV; 5 – amostra 30 *primer* globina; 6 – amostra 30 *primer* HPV; 7 – amostra 54 *primer* globina; 8 – amostra 54 *primer* HPV; 9 – amostra 18 *primer* globina; poço 10 – amostra 18 *primer* HPV.

Tabela 9. Distribuição das 617 amostras de mulheres analisadas quanto à detecção viral.

HPV	Detecção viral MY09/MY11
Positivo	396 (64,18%)
Negativo	221 (35,82%)
Total	617

5.5. Tipificação viral das amostras do grupo de estudo

A partir das amostras positivas para o HPV, e a partir do uso dos *primers* específicos para HPV 16, 18, 31 e 33 foi realizada a amplificação por PCR, para tipificação de tais amostras (figura 14) obtendo-se, a partir das 396 amostras positivas, 60,85% infectadas pelo HPV 16; 2,27% pelo HPV 18; 23,24% pelo HPV 31; e 5,80% pelo HPV 33 (Tabela 10). 108 das 396 amostras positivas não puderam ser classificadas em nenhum dos quatro tipos virais estudados.

Nosso experimento contou com a análise de um total de 863 amostras de 617 mulheres. Algumas pacientes possuíam mais de uma amostra, coletada de diferentes regiões do aparelho reprodutivo, no entanto, os resultados das diferentes amostras da mesma paciente se comportavam sempre da mesma maneira, apresentando resultados idênticos de detecção e tipificação viral, confirmando e validando o presente estudo.

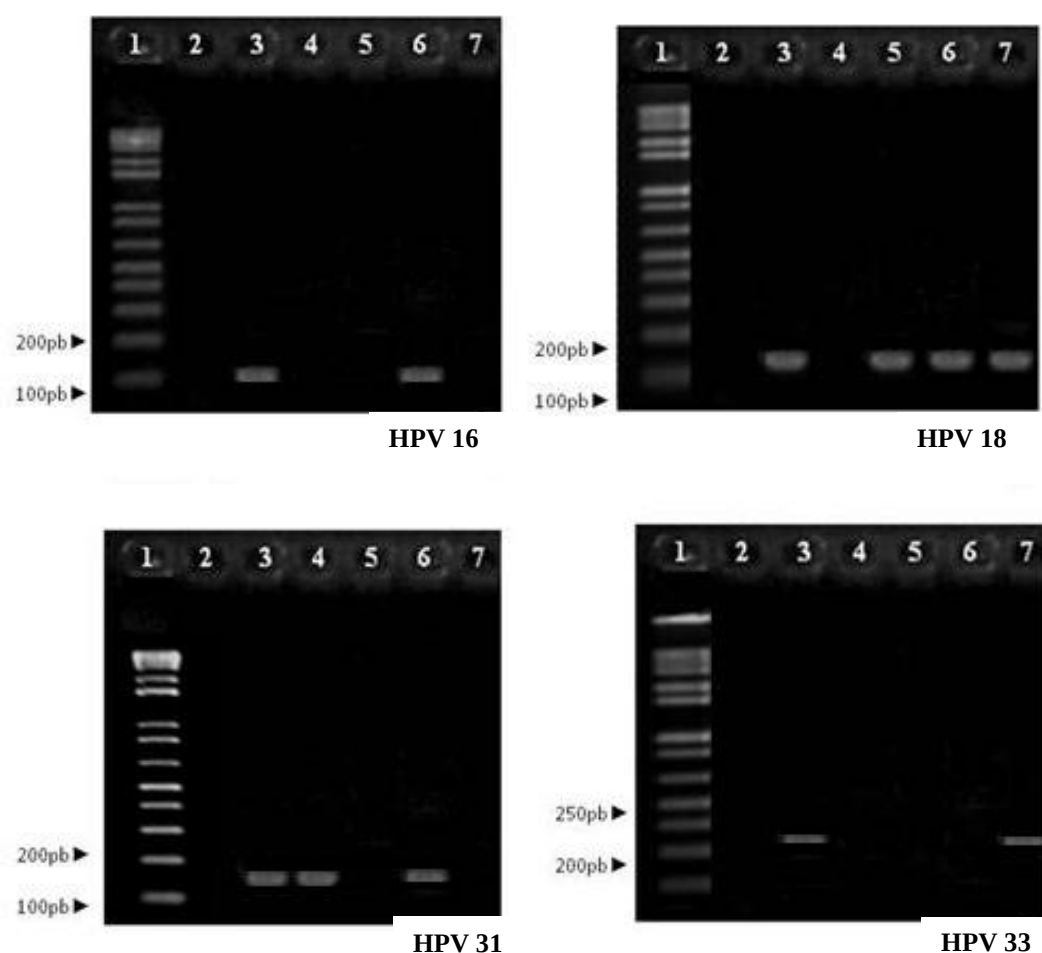


Figura 14. Resultado ilustrativo da tipificação viral de algumas amostras. Tipificação para HPV 16 [1. marcador 100pb, 2. controle negativo, 3. controle positivo, 4. amostra negativa, 5. amostra positiva (119pb), 6. amostra positiva (119pb), 7. amostra positiva (119pb)]; Tipificação para HPV 18 [1. marcador 100pb, 2. controle negativo, 3. controle positivo, 4. amostra negativa, 5. amostra negativa, 6. amostra positiva (172pb), 7. amostra negativa]; Tipificação para HPV31 [1. marcador 100pb, 2. controle negativo, 3. controle positivo, 4. amostra positiva (153pb), 5. amostra negativa, 6. amostra positiva (153pb), 7. amostra negativa]; Tipificação para HPV 33 [1. marcador 100pb, 2. controle negativo, 3. controle positivo, 4. amostra negativa, 5. amostra negativa, 6. amostra negativa, 7. amostra positiva (211pb)].

Tabela 10. Distribuição 396 amostras de mulheres positivas quanto à tipificação viral.

HPV	HPV16	HPV 18	HPV31	HPV33
Positivo	241 (60,85%)	9 (2,27%)	92 (23,24%)	23 (5,80%)
Negativo	155 (39,15%)	388 (97,73%)	304 (76,76%)	373 (94,20%)
Total	396	396	396	396

A tabela 11 indica que das amostras positivas para o papilomavírus 0,50% apresentavam infecção conjunta dos tipos virais 16 e 18; 13,39% para os tipos 16 e 31; 3,53% para os tipos 16 e 33; 0,25% para os tipos 18 e 31; 0,25% para os tipos 16, 18 e 31; e 0,75% para os tipos 16, 31 e 33.

Tabela 11. Distribuição dos 396 casos de mulheres positivas analisadas, indicando os 75 casos de infecção conjunta.

Infecção conjunta	HPV 16/18	HPV 16/31	HPV 16/33	HPV 18/31	HPV 16/18/31	HPV 16/31/33
Positivo	2 (0,50%)	53 (13,39%)	14 (3,53%)	2 (0,25%)	1 (0,25%)	3 (0,75%)
Negativo	394 (99,50%)	343 (87,16%)	382 (96,47%)	395 (99,75%)	396 (99,75%)	393 (99,35%)
Total	396	396	396	396	396	396

5.6. Análise citológica cérvico-vaginal das amostras randômicas das pacientes do grupo de estudo

Com base nos dados clínicos obtidos de uma parcela das amostras analisadas, pudemos relacionar o tipo viral com o grau e tipo de lesão de 123 amostras analisadas randomicamente. Os dados estão relacionados na tabela 12.

Foi observado que as mulheres infectadas pelo HPV 16 tiveram alta prevalência de LSIL (57,45%) e apenas 33,34% de HSIL. Quando analisamos o segundo tipo mais comum (HPV 31), encontramos o inverso, 11,11% para HSIL e 6,38% para LSIL. Quanto ao HPV 33, não foram encontradas lesões detectáveis. Os valores para HPV 31 são mais elevados do que o quarto mais comum, HPV 18, em que se observou 2,13% para LSIL e 2,22% para HSIL. Nos resultados para infecção conjunta verificou-se que para mulheres infectadas com o HPV 16/31, 11,11% apresentavam HSIL e para HPV 16/31/33 o HSIL foi de 44,44%. Para o HPV 18/31 encontramos apenas HSIL (2,22%).

Quando se analisou carcinoma encontramos 53,58% para HPV 16, seguido pelo HPV 31 (7,14%). Para infecção conjunta HPV 16/31 verificou-se que havia 7,14% e HPV 16/33, 10,71%.

Tabela 12. Relação do tipo viral e tipo de lesão ocorrente em 123 amostras randômicas analisadas quanto ao tipo de lesão (ASCUS: células escamosas atípicas de significado indeterminado; HSIL: lesão intraepitelial de alto grau; LSIL: lesão intraepitelial de baixo grau).

Tipo viral	Carcinoma	ASCUS	LSIL	HSIL
16	15(53.58%)	0	27(57.45%)	15(33.34%)
18	0	0	1(2.13%)	1(2.22%)
31	2(7.14%)	0	3(6.38%)	5(11.11%)
33	0	0	0	0
16/18	0	0	1(2.13%)	0
16/31	2(7.14%)	0	2(4.25%)	5(11.11%)
16/33	3(10.71%)	0	3(6.38%)	0
18/31	0	0	0	1(2.22%)
16/31/33	0	0	1(2.13%)	2(4.44%)
Não tipado	6(21.42%)	3(100%)	9(19.14%)	17(37.78%)
Total	28	3	47	45

5.7. Análise dos locais das lesões das amostras das pacientes do grupo de estudo

Excluindo as 108 mulheres positivas que não se enquadraram em nenhum dos quatro tipos virais estudados, obtivemos um total de 288 mulheres positivas para um dos 4 tipos virais, totalizando as 396 mulheres positivas analisadas.

Das 288 mulheres positivas pudemos comparar o local da extração da lesão com o tipo viral estudado. Foi considerado as amostras que provenieram de locais específicos do aparelho reprodutor feminino e também amostras coletadas de zonas intermediárias de mais de um local da região de extração.

Foi verificado que 56,92% das amostras extraídas da vulva e 57,14% amostras da vagina, 66,94% do colo uterino e vagina, e 49,42% do colo uterino eram pertencentes ao HPV 16 (tabela 13). Em segundo lugar observamos que amostras extraídas dos mesmos locais eram do tipo viral 31. A infecção conjunta 16/31 apresentou as maiores proporções para as amostras extraídas em relação às outras infecções conjuntas, como demonstra a tabela 13.

Tabela 13. Análise das 288 mulheres positivas para um dos 4 tipos virais, indicando o local da extração da lesão e sua relação com os tipos virais estudados.

Tipo viral/ Local da lesão	vulva	vagina	colo uterino + vagina	colo uterino	verruga	verruga + vulva
16	37(56,92%)	4(57,14%)	79(66,94%)	43(49,42%)	1(50%)	2(33,34%)
18	0	0	2(1,69%)	1(1,14%)	0	1(16,67%)
31	9(13,84%)	1(14,28%)	11(9,32%)	12(13,79%)	0	1(16,67%)
33	0	0	2(1,69%)	4(4,59%)	0	0
16 /18	0	2(28,57%)	2(1,69%)	0	0	0
16/31	15(23,07%)	0	9(7,62%)	24(27,58%)	1(50%)	2(33,34%)
16/33	3(4,61%)	0	9(7,62%)	2(2,30%)	0	0
16/31/33	0	0	3(2,54%)	0	0	0
16/18/31	0	0	0	1(1,14%)	0	0
18/31	1(1,53%)	0	4(0,86%)	0	0	0
Total	65	7	121	87	2	6

Colo uterino+vagina; verruga+vulva. Extração de material feita de uma zona intermediária entre os locais em questão.

6. Discussão

Os dados obtidos neste estudo demonstraram que a população de Recife apresenta uma prevalência maior do papilomavírus humano tipo 16, seguido pelo HPV 31 (23,24%), seguido pelo HPV 33 (5,80%) quando comparado com o HPV 18 (2,27%), indicando que com números tão discrepantes, medidas de vacinação não podem ser utilizadas da mesma forma nas diferentes regiões do Brasil. Estes resultados são importantes para programar no sistema público de saúde o processo de produção e distribuição de vacinas contra o HPV.

Em todo o mundo, o HPV tipo 16 é o mais freqüente em cânceres cervicais, com exceção da Indonésia, onde prevalece o tipo 18 (Bosch *et al.*, 1995; Boer *et al.*, 2006). Cerca de 70% dos tipos oncogênicos de HPV estão atribuídos aos tipos virais 16 e 18 (Koutsky e Harper, 2006), já que estes possuem maior capacidade de manter infecções com ou sem alterações citológicas, em comparação com outros tipos virais (Fernandes *et al.*, 2009).

No Brasil, o HPV tipo 16 é também o mais freqüente, seguido pelos tipos 18, 31 e 33. No que se refere ao segundo tipo mais prevalente, porém existem variações de acordo com a região brasileira. No Nordeste e Centro-Oeste, os HPVs tipo 31 e 33 são os que apresentam maior incidência depois do HPV 16, enquanto que nas regiões Norte, Sudeste e Sul, o HPV 18 é o segundo mais freqüente entre os casos de câncer cervical (Bosch *et al.*, 1995; Noronha *et al.*, 1999; Lorenzato *et al.*, 2000).

No trabalho realizado por Illades-Aguiar *et al.* (2008) foi encontrado uma predominância maior do tipo viral 33 em mulheres com citologia normal, quando comparadas com o HPV 16, comumente mais encontrado em quase todo o mundo. No entanto, a distribuição dos tipos de HPV em mulheres com citologia normal, segundo a

Agência Internacional de Pesquisa em Câncer em 2005 (Clifford *et al.*, 2005) mostra que o tipo 16 é o mais comum, seguido pelos HPV 42, 58, 31, 18, 56, 81, 35, 33 e 45, o que também difere de nosso resultado, já que existe maior prevalência do tipo 31 e 33, em relação ao tipo 18, e o HPV 16 é o mais comum entre todos os tipos virais estudados.

Em outros trabalhos (Schlecht *et al.*, 2001; van der Graaf *et al.*, 2002) foram relatados que o risco de se desenvolver câncer de colo uterino em mulheres com os tipos oncogênicos 18, 31 ou 33 têm um risco maior do que 50 vezes comparado ao daquelas não-infectadas e, se considerado o HPV 16, este risco tem aumento de mais de 100 vezes. Isto indica que em relação à infecção viral, o tipo viral é determinante em provocar maior incidência, maior infecção e progressão viral.

As vacinas que foram desenvolvidas no intuito de prevenção mostram falhas, sendo eficazes na prevenção de infecção tipo-específicas, e não contra todos os tipos virais. As vacinas comerciais desenvolvidas deixam de fora pelo menos 13 outros papilomavírus oncogênicos responsáveis por quase 30% de todos os casos de câncer cervical (Rambout *et al.* (2007) e Giroglou *et al.* (2001). As duas vacinas disponíveis hoje no mercado (bivalente – contra os HPV 16 e 18, e quadrivalente – contra os HPV 16, 18, 6 e 11) não correspondem a dois dos tipos virais mais incidentes na população da região do Recife, Pernambuco, os quais são os HPV 31 e 33. Com isso, o processo de vacinação nesta região pode aumentar a incidência dos tipos de HPV menos comuns, como tipo 18 e/ou os tipos 6 e 11, caso sejam utilizadas pela população as vacinas bi ou quadrivalentes, respectivamente.

A preocupação que se tem a respeito da prevalência de certos tipos virais e o sistema público de saúde é se as infecções por HPV são independentes umas das outras; se tipos de HPV distante ou proximamente relacionados competem por um nicho celular

específico no interior do epitélio; e se a persistência ou desaparecimento do vírus é dependente e/ou influenciada pela co-infecção com outros tipos de HPV. Alguns estudos demonstram que a presença de infecções por HPV cérvico-vaginal pré-existentes aumenta o risco de aquisição de outros genótipos de HPV tanto em mulheres quanto em homens, o que implica que a competição por nicho é improvável. Por outro lado, as evidências disponíveis indicam que infecções por HPV são independentes umas das outras, e não sugerem que ocorra a substituição de genótipo (Stanley *et al.*, 2006). Portanto, há um risco claro de que tipos virais com incidência diferente nas várias regiões do Brasil podem não responder da mesma maneira, no processo de vacinação não polivalente existente.

Nosso estudo demonstrou ainda uma porcentagem elevada de infecção conjunta relacionada aos tipos virais estudados, indicando que a infecção conjunta HPV16/31 é de 13,39% e a infecção HPV 16/33 é de 3,53%. Estudos mostram que a detecção concomitante ou sequencial de mais de um tipo de HPV é comum e mais freqüente do que seria esperado ao acaso (Ho, 1998; Thomas *et al.*, 2002; Liaw *et al.*, 2001; Rousseau, *et al.* 2001; Mendez, *et al.*, 2005; Kjaer, *et al.*, 2005; Lajous, *et al.*, 2005). Se os diferentes tipos de HPV competem pelo epitélio cervical, a prevalência desses tipos que não são alvos da vacinação pode aumentar (Liaw *et al.*, 2001; Rousseau, *et al.* 2001). Se a co-infecção confere algum benefício tipo-específico mútuo de sobrevivência, a eliminação de um tipo de HPV poderia ter um efeito benéfico inesperado na história natural de outros (Woodman *et al.*, 2007).

Vários estudos indicam que os anticorpos neutralizantes gerados por VLPs de L1 são tipo-específicos e não exibem reação cruzada (Giroglou *et al.*, 2001; Orozco *et al.*, 2005; Fleury *et al.*, 2006), compartilhando um ou mais epítomos com neutralização cruzada. Porém, esses epítomos parecem ser menos imunogênicos do que os epítomos

tipo-específicos (Combita *et al.*, 2002; Fleury *et al.*, 2006), assim a reação cruzada induzida por eles deve ser muito baixa, insuficiente para conferir proteção (Combita *et al.*, 2002).

Logo, apresentar à população recifense vacina bivalente ou quadrivalente, que não seja eficaz contra os tipos 31 e 33 podem levar a conseqüências desastrosas. Com um índice significativo de infecção conjunta HPV 16/31 e HPV 16/33 fica claro, com base nos estudos mencionados acima, que a vacinação comercializada seria prejudicial à nossa população, quando se fala de infecção por mais de um tipo viral.

No que diz respeito à infecção pelo HPV relacionado ao tipo e grau de lesão, a maioria das lesões foram caracterizadas como carcinoma, HSIL e LSIL, diretamente relacionadas com a freqüência do tipo viral encontrado nas amostras.

Estudos têm demonstrado que as lesões estão relacionadas com a elevada taxa de lesões de baixo e alto risco, embora eles não demonstrem relação com os tipos virais encontrados. A presente análise mostrou que as mulheres infectadas pelo HPV tipo 16 apresentavam elevado nível de LSIL (57,45%) e nível menor de HSIL (33,34%), mas quando se analisou as mulheres infectadas com o HPV tipo 31, o nível de HSIL (11,11%) foi maior quando comparado com LSIL - lesão intraepitelial de baixo grau (6,38%). Estes dados indicam que, apesar de HPV 16 possuir uma maior proporção de HSIL em relação ao HPV 31, quando se compara com LSIL, pudemos observar que o HPV 31 apresentou-se mais maligno, comparado com o HPV 16. A freqüência de lesões de alto e baixo grau para HPV 31 foi superior às encontradas em mulheres infectadas pelo HPV 18 (2,13% para LSIL e 2,22% de HSIL). Nossos dados mostram que o HPV 31 é o segundo tipo mais freqüente no Recife e, portanto, mais maligno do que o HPV 18, o quarto mais comum em Recife, PE.

Capra *et al.* (2007) observaram que mulheres do sul da Itália quando eram infectadas pelo HPV 16 apresentavam lesões intraepiteliais de alto grau, porém quando infectadas pelos tipos 31 ou 33 apresentavam também maior índice de lesões do tipo HSIL, porém com porcentagens menores (14,3%) do que as infectadas pelos tipos 16 (42,8%). Em relação ao tipo viral 18 não foi observada nenhum tipo de lesão HSIL. Lambert *et al.* (1999); Auger *et al.* (1997); Viahos *et al.* (2000); Lima *et al.* (2002); Yarandi *et al.* (2004); Yaiti *et al.* (2005) demonstraram que lesões encontradas estão relacionadas à alta incidência de lesões de baixo e alto risco, mas nenhum destes estudos demonstrou sua relação com os tipos virais encontrados.

Cavalcanti (1998) também com a finalidade de contribuir para um melhor conhecimento do eventual papel do HPV na etiopatogênese do câncer cervical na região norte do Brasil, estudou a prevalência do vírus em mulheres portadoras de lesões de cérvix uterina, atendidas no "Instituto Ofir Loiola" (IOL), em Belém, Pará. Em seu estudo 155 mulheres apresentavam carcinoma epidermóide invasor ou adenocarcinoma (grupo A), 54 eram portadoras de neoplasia intraepitelial cervical grau II ou III (NIC II e NIC III) (grupo B) e 19 eram pacientes com cervicite crônica (grupo C). O HPV 16 foi predominante, representando 60,4% das amostras positivas do grupo A, 54,5% daquelas do grupo B. Os HPVs tipo 16, 18 e 33 representaram 71,4% dos detectados no grupo C.

Nosso estudo, no entanto demonstrou que mulheres infectadas pelo tipo viral 16 apresentavam incidência maior de lesões LSIL que HSIL, no entanto, quando mulheres eram infectadas pelos tipos 31 a incidência de lesões HSIL eram bem maiores que para LSIL, podendo indicar que as mulheres do Recife apresentam uma relação entre o tipo viral 31 e as lesões HSIL, justificando que quando se encontram infectadas pelo HPV 31 há maior malignidade da lesão.

Quando analisamos as lesões HSIL relacionando com infecção conjunta, os resultados mostram que quando as mulheres estavam infectadas com o HPV 16, conjuntamente com o HPV 31 (11,11%) ou com HPV 31 e 33 (44,44%) observamos maior malignidade da lesão, em comparação com mulheres infectadas pelo HPV 16/18 e 16/33, que não apresentou nenhuma lesão intraepitelial de alto grau. Estes dados demonstraram que, quando o tipo mais prevalente em Recife, o HPV 16, estava associado com o segundo mais comum, HPV 31, ou o terceiro, HPV 33, a malignidade era maior do que quando as mulheres estavam infectadas com HPV 16/18 (0%) ou HPV 16/31 (2,22%). Estes dados sugerem que o HPV 31 ou 33 apresentava malignidade menor quando estes tipos estavam associados ao HPV 18.

Estudando os efeitos de LSIL foi observado que pacientes HPV 16/33 apresentavam 6,38% de lesão de baixo grau, quando comparado com o HPV 16/31 (4,25%), sugerindo que a associação do tipo mais comum na população, o tipo viral 16, e os terceiro mais comum HPV 33, podem ser piores para as mulheres do Recife, do que quando o HPV 16 está associado ao HPV 31.

Resultados semelhantes foram observados para carcinoma. Pacientes infectadas com o HPV 16 tiveram maior incidência de carcinoma (53,58%), seguido pelo HPV 31 (7,14%) e, quando estes tipos virais estavam associados entre si, a malignidade era maior em comparação com HPV 16/18 ou HPV 18/31, que não apresentavam carcinoma, demonstrando maior malignização do HPV 31 e 33 conjuntamente ao HPV 16.

Não existem dados na literatura que relacionam infecção conjunta com tipo de lesão sendo estes dados de extrema relevância para estudos posteriores, já que demonstrou claramente uma relação específica entre infecções conjuntas HPV 16/31 e HPV 16/33 e HSIL e carcinomas, indicando que a associação de dois dos mais

incidentes tipos virais encontrados em Recife promove mais prejuízos citológicos às pacientes, e que juntamente com os demais resultados acima a vacina atualmente disponível não teria o efeito desejado sobre a população recifense.

As amostras de pacientes podem ser coletadas de diferentes locais, dependendo de onde é observada a lesão. Algumas lesões podem ser observadas na vulva, na vagina, em verrugas e no colo uterino. Além disso, podem ser observadas lesões difíceis de serem coletadas de locais específicos do aparelho reprodutivo, sendo coletados de forma intermediária em uma zona de transição entre dois ou mais locais, como acontece em lesões na verruga mais vulva, e/ou colo uterino mais vagina.

Avaliando o local onde foram observadas e coletadas amostras de lesões das pacientes relacionamos os locais com os tipos virais mais prevalentes em Recife. Nosso estudo sugere que extrações da vulva, vagina colo uterino + vagina e colo uterino apresentavam alto índice do HPV 16. No entanto, quanto ao segundo mais prevalente, o HPV 31, os resultados eram diferentes. Enquanto que para extrações de vulva, vagina, colo uterino + vagina, colo uterino e verruga, o tipo viral 31 aparecia como segundo mais prevalente, para extrações de verruga + vulva, os HPV 18 e 33 apareciam em igual proporção (16,67% cada).

Estes dados não são suficientes para se obter uma conclusão precisa sobre a relação entre tipo viral e local de extração, por ter sido realizado com um número amostral pequeno, fazendo-se necessário uma pesquisa mais aprofundada sobre o assunto. No entanto, podem contribuir à população recifense e centros de pesquisas referentes ao papilomavírus humano.

Quando se fala no tipo viral mais prevalente em Recife (HPV 16) as lesões podem aparecer em quaisquer locais do aparelho reprodutivo, constatando sua abrangência e gravidade de lesão em diferentes locais. O mesmo pode ser visto quando

se indicou o HPV 31 como sendo o segundo mais prevalente, porém embora este possua uma abrangência elevada de locais onde pode infectar, este tipo viral não foi observado em verrugas genitais. O mesmo se observou para o HPV 33 e o HPV 18. Quando se compara o tipo viral 18 com o HPV 31, notou-se que a abrangência de locais de infecção do HPV 31 era muito mais diversificada que o tipo 18, o qual apenas apareceu, de forma relevante, no colo uterino, colo uterino e vagina, e verruga e vulva, não aparecendo em lesões da vulva, vagina e verrugas.

Avaliando as infecções conjuntas observou-se que para a maioria das extrações o tipo mais incidente era o HPV 16/31, enquanto que para extrações vaginais o tipo mais prevalente era a infecção conjunta 16/18.

Por estes resultados podemos observar que a infecção conjunta entre o tipo mais prevalente (HPV 16) mais o segundo mais comum (HPV 31), em conjunto (HPV 16/31) apresentam maior gravidade, pois infectam com índice elevado a vulva, colo uterino e vagina, colo uterino, verrugas, e verrugas e vulva. Apenas quando a lesão é retirada da vagina é que se observa o quarto HPV mais prevalente (HPV 18) como sendo mais infectante, ainda assim quando ele está infectando conjuntamente com o tipo viral 16 (HPV 16/18).

A maioria das infecções é assintomática ou inaparente. Podem apresentar-se clinicamente sob a forma de lesões exofíticas. A infecção pode também assumir uma forma denominada subclínica, visível apenas sob técnicas de magnificação e após aplicação de reagentes, como o ácido acético. Os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56 e 58, são encontrados ocasionalmente na forma clínica da infecção (verrugas genitais) e têm sido associados com lesões externas (vulva, pênis e ânus), com neoplasias intra-epiteliais ou invasivas no colo uterino e vagina. Quando na genitália externa, estão associados a carcinoma *in situ* de células escamosas, Papulose Bowenoide, Eritroplasia

de Queyrat e Doença de Bowen da genitália. Pacientes que tem verrugas genitais podem estar infectados simultaneamente com vários tipos de HPV. Os tipos 6 e 11 raramente se associam com carcinoma invasivo de células escamosas da genitália externa. Diversos outros autores também relatam que em geral os HPVs de alto risco, dentre eles os tipos virais 16, 18, 31 e 33 infectam geralmente colo do útero, vulva vagina, pênis e ânus (Derchan e Sarian, 2007; Rama *et al.*, 2008).

Com isso, tanto para infecção por um ou mais tipos de papilomavírus, só vêm a reforçar os resultados obtidos neste experimento, em que o tipo mais prevalente, o HPV 16 abrange mais locais de infecção, seguido pelo papilomavírus humano 31. Também através destes resultados podemos inferir que as mulheres recifenses, quando se trata do papilomavirus 16 as lesões podem aparecer em qualquer local do aparelho reprodutivo, no entanto quando se fala em HPV 31 este não aparece em verrugas. No entanto, quando aparecer infecção conjunta 16/31 as lesões podem aparecer em quaisquer locais, já o HPV 18 irá apresentar lesões apenas no colo uterino, estando livres de lesões nos demais locais.

Como acontece em várias regiões do Brasil, os serviços de prevenção da neoplasia cervical são deficitários. O maior desafio para o processo de vacinação é fornecer vacinação mais barata, simples e que cubra mais tipos de HPV. Os HPVs de alto risco tipo 31 e 33, os quais não estão presentes nas vacinas comercializadas, têm uma importante prevalência na região Nordeste do Brasil, em especial em Recife, onde se tem uma alta taxa de incidência de câncer cervical. Portanto, mesmo com o processo parcial de vacinação atual, outros tipos de HPV, com potenciais oncogênicos variados, permanecerão causando lesões cervicais clinicamente significativas. Ainda que as atuais vacinas profiláticas protejam as mulheres ainda não infectadas contra os vírus de maior potencial oncogênico, aquelas infectadas antes da vacinação ou infectadas com outros

tipos virais não incluídos na vacina, ainda necessitarão de diagnósticos e tratamentos de lesões pré-neoplásicas.

Além disso, a proteção das vacinas é efetiva apenas antes da exposição ao vírus. Para reduzir os programas de controle baseados na detecção das lesões precursoras do câncer cervical uterino, a vacina deveria ser polivalente, incluindo os tipos virais dominantes em cada população a ser imunizada. Não se sabe também o tempo durante o qual os indivíduos estarão protegidos, já que os estudos atuais estão limitados por cinco anos. Outros aspectos ainda não esclarecidos se referem a qual seria a real proteção cruzada contra outros tipos de HPV, se as infecções precoces serão afetadas, se haverá proteção para homens (Giuliano e Palefsky, 2009), se há moduladores da proteção desconhecidos e se há marcadores imunológicos de proteção, disponíveis.

Com base nos resultados apresentados, e com base em dados não conclusivos da eficácia da vacina bivalente e quadrivalente contra os tipos 31 e 33, concluímos que esta vacina não atende às necessidades da população recifense. Apesar de haver estudos indicando a proteção da vacina contra estes dois tipos acima mencionados (Derchan e Saruan, 2007; Nadal e Nadal, 2008; Tovar *et al.*, 2008), nada se pode dizer da eficácia na população quando os tipos virais 31 e 33 são tão ou mais incidentes de que os tipos virais presentes na vacina disponível.

A identificação de tipos de HPV que são mais comumente associados ao câncer cervical em diferentes regiões tem implicações nas estratégias de prevenção, incluindo o desenvolvimento de vacinas efetivas, adequadas a cada região, contendo os tipos virais mais prevalentes. Assim, variações regionais na distribuição de determinados tipos de HPV devem ser levadas em consideração no desenvolvimento de novas vacinas.

7. Conclusões

1. o HPV 16 é o mais freqüentemente encontrado na população do Recife, Pernambuco, seguido pelo HPV 31 e HPV 33;
2. há um maior índice de mulheres infectadas conjuntamente pelo HPV16/31, em relação aos outros tipos de infecção conjunta;
3. o tipo viral 16 está associado à alta incidência de lesões LSIL, e que mulheres infectadas pelos tipos 31 e 33 apresentaram, proporcionalmente, maior incidência de lesões HSIL em comparação com LSIL;
4. mulheres infectadas pelos tipos virais 31 e 33, com ou sem infecção conjunta com outros tipos, apresentam em sua grande maioria lesões do tipo HSIL e carcinomas, cuja proporção é mais elevada que para o tipo viral 18, indicando uma clara relação específica entre as mulheres recifenses positivas para os HPV mais incidentes na região e o tipo de lesão relacionada (HSIL e carcinoma);
5. extrações da vulva, vagina, colo uterino + vagina e colo uterino apresentavam alto índice do HPV 16. Para extrações de vulva, vagina, colo uterino + vagina, colo uterino e verruga, o tipo viral 31 aparece como segundo mais prevalente; para extrações de verruga + vulva, os HPV 18 e 33 aparecem em igual proporção (16,67% cada);
6. a maioria das extrações o tipo mais incidente era o HPV 16/31, enquanto que para extrações vaginais o tipo mais prevalente era a infecção conjunta 16/18;
7. as vacinas profiláticas disponibilizadas recentemente são específicas para combater dois tipos de HPV de alto risco 16 e 18 (vacina bivalente) e quatro tipos de HPV, incluindo alto (HPV 16 e 18) e baixo risco (HPV 6 e 11), não incluindo os tipos potencialmente oncogênicos encontrados em nossa região;

8. é muito importante o estudo e desenvolvimento de vacinas profiláticas que atendam às necessidades regionais como, por exemplo, uma vacina que incluísse os tipos virais 31 e 33;

9. o sistema público de saúde deve, juntamente com os órgãos de pesquisa identificar os tipos de HPV mais comumente associados ao câncer cervical nas diferentes regiões, promovendo estratégias de prevenção, incluindo o desenvolvimento de vacinas efetivas, adequadas a cada região, aprimorando estratégias que atinjam especificamente as necessidades regionais, levando a redução na frequência de casos de câncer e maior controle da transmissão viral.

8. Referências Bibliográficas

- Alonso-Amelot ME, Oliveros A, Calcagno MP, Arellano E (2001). Bracken adaptation mechanisms and xenobiotic chemistry. *Pure Appl Chem.* 73(3): 549–553.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Peter P (2002). *Molecular Biology of the Cell* 4^a ed. 1616 p.
- Alves AEM, Costa MRM, Lobato L, Fernandes ML, et al. (2004) O impacto do polimorfismo no gene *Mbl* (manose binding lectin) na infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (*HIV*). *Revista Científica da UFPA* <http://www.ufpa.br/revistaic>. Vol 4.
- Apple RA, Erlich HÁ, Klitz W, Manos MM, et al. (1994). HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus type specificity. *Nature Genetics.* 6: 157-162.
- Apt D, Watts RM, Suske G, Bernard U (1996). High Sp1/Sp3 ratios in epithelial cells during epithelial differentiation and cellular transcription correlate with the activation of the HPV-16 promoter. *Virology.* 224: 281– 291.
- Auger M, Charbonneau M, Arseneau J (1997). Atypical squamous cells of undetermined significance. A cytohistologic study of 52 cases. *Acta Cytol.* 41(6): 1671-1675.
- Baseman JG, Koutsky LA (2005). The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol.* 1: 16-24.
- Beçak W, Carvalho RF, Ruiz RM, Stocco RC, et al. (2009a). BPV-1 L1 expression in *E. coli*. In: 25th International Papillomavirus Conference Clinical and Educational Workshop. Malmö, Sweden.

- Beçak W, Campos S, Ferraz OP, Birgll Jr EH, et al. (2009b). Similar chromosome aberrations in BPV neoplastic cells and lymphocytes. In: 25th International Papillomavirus Conference Clinical and Educational Workshop. Malmö, Sweden.
- Beçak W, Miranda PM, Pitol BCV, Movan MS, et al. (2009c). Human papillomavirus prevalence in woman routine evaluation, Ouro Preto, Brazil. In: 25th International Papillomavirus Conference Clinical and Educational Workshop. Malmö, Sweden.
- Bergeron C (2003). The 2001 Bethesda system. *Salud Pùblica de México*. 45(3): 340-344.
- Bernard HU (2002). Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *AntivirTher*. 7: 219–237.
- Bierl C, Karem K, Poon AC, Swan D, et al. (2005). Correlates of cervical mucosal antibodies to human papillomavirus 16: results from a case control study. *Gynecol Oncol*. 99: 262-268.
- Boer MA, Vet JN, Aziz MF, Cornain S, et al. (2006). Human papillomavirus type 18 and other risk factors for cervical cancer in Jakarta, Indonesia. *Int J Gynecol Cancer*. 16(5): 1809-1814.
- Bontkes HJ, Ruizendaal JJ, Kramer D, Meijer CJ, et al. (2005). Plasmacytoid dendritic cells are present in cervical carcinoma and become activated by human papillomavirus type 16 virus-like particles. *Gynecol Oncol*. 96: 897–901.
- Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, et al. (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC). *J Natl Cancer Inst*. 87: 796-802.

- Breitbart F, Kirnbauer R, Hubbert NL, Nonnenmacher B, et al. (1995). Immunization with viruslike particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J Virol.* 69: 3959-3963.
- Brenna S and Syrjänen K (2003). Regulation of cell cycles is of key importance in human papillomavirus (HPV)-associated cervical carcinogenesis. *São Paulo Medical Journal.* 121(3): 128-132.
- Brinton LA, Reeves WC, Brenes MM, Herrero R, et al. (1989). Parity a risk factor for cervical cancer. *Am J Epidemiol.* 130: 486-496.
- Brisson J, Morin C, Fortier M, Roy M, et al. (1994). Risk factors for cervical cancer intraepithelial neoplasia: differences between low- and high-grade lesions. *Am J Epidemiol.* 140(8): 700-710.
- Bryan JT (2007). Developing an HPV vaccine to prevent cervical cancer and genital warts. *Vaccine.* 25: 3001–3006.
- Burd EM (2003). Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiol. Rev.* 1-17.
- Burk RD, Kelly P, Feldman J, Bromberg J, et al. (1996). Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex Transm Dis.* 23(4): 333-341.
- Camilleri G and Blundell R (2009). The human papillomaviruses (HPVs) and HPV DNA testing. *Res J Biol Sciences.* 4(1): 29-36.
- Campo MS (2003) Papillomavírus and disease in humans and animals. *Vet Comp Oncol.* 1: 3-14.
- Capra G, Giovannelli L, Bellavia C, Migliore MC, et al. (2007). HPV genotype prevalence in cytologically abnormal cervical samples from women living in south Italy. *Virus Res.* 133: 195-200.

- Cavalcanti SM, Frugulhetti IC, Passos MR, Fonseca MF, et al. (1994). Prevalence of human papillomavirus DNA in female cervical lesions from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 89: 575-580.
- Cavalcanti VLN (1998). Papilomavírus humano associado a lesões de cérvix uterina. *Rev Soc Bras de Med Tropical*. 31(4): 399-400.
- Cheah PL and Looi NM (1998). Biology and pathological associations of the human papillomaviruses: a review. *Malays J Pathol*. 20: 1–10.
- Chen XS, Garcea RL, Goldberg I, Casini G, et al. (2000). Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell*. 5(3): 557-567.
- Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, et al. (2003). Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a metaanalysis. *Br J Cancer*. 88: 63–73.
- Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Munõz N, et al. (2005). Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet*. 366(9490): 991-998.
- Coffer PJ and Kruijer W (1995). EGF receptor deletions define a region specifically mediating STAT transcription factor activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 210: 74–81.
- Coimbra EC, Souza HM, Leitão MCG, Santos JF, et al. (2007). Virus-Like Particles as a vaccinal strategy against tumors induced by papillomavirus infection. *Com Cur Res Educ Topics Trends Appl Microbiol*. 2: 689-696.

- Combata AL, Touze A, Bousarghin L, Christensen ND, et al. (2002). Identification of two cross-neutralizing linear epitopes within the L1 major capsid protein of human papillomaviruses. *J Virol.* 76(13): 6480–6486.
- Cubie HA (2007). Papillomaviruses and polyomaviruses. In: Greenwood D, Slack R, Peutherer J, Barer M (2007). *Medical Microbiology*. 17th. Ed. United Kingdom: Churhill Livingstone Elsevier 45: 446-456.
- Cuzick J, Mayrand MH, Ronco G, Snijders P, et al. (2006). New dimensions in cervical cancer screening. *Vaccine.* 24(3): 90-97.
- da Silva DM, Eiben GL, Fausch SC, Wakabayashi MT, et al. (2001). Cervical cancer vaccines: emerging concepts and developments. *J Cellular Physiol.* 186:169-182.
- Derchan SFM and Sarian LOZ (2007). Vacinas profiláticas para o HPV. *Res Bras Ginecol Obstet.* 29(6): 281-284.
- Derchan SFM, Naud P, Roteli-Martins C, Longatto-Filho A, et al. (2008). Safety of screening with human papillomavirus testing for cervical cancer at three year intervals in a high-risk population: experience from the LAMS study. *J Med Scren.* 15(2): 97-104.
- De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, et al. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology.* 324: 17–27.
- Donadi EA (2001). Aspectos moleculares do complexo principal de histocompatibilidade: como entender a associação entre o sistema HLA e as doenças reumáticas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 17: 601-611.
- Doorbar J (2005). The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 32(1): 7–15.
- Doorbar J (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci.* 110: 525–541.

- Dray M, Russell P, Dalrymple C, Wallman N, et al. (2005). p16(INK4a) as a complementary marker of high-grade intraepithelial lesions of the uterine cervix I: experience with squamous lesions in 189 consecutive cervical biopsies. *Pathology*. 37(2): 112–124.
- Duggan KMF, Keating PJ, Stevens FR, Sinnott P, et al. (1999). Immunogenetic factors in HPV-associated cervical cancer: influence on disease progression. *Eur J Immunogenet*. 23(4): 275-284.
- Dupuy C, Buzoni-Gatel D, Touzé A, Bout D, et al. (1999). Nasal immunization of mice with human papillomavirus type 16 (HPV-16) virus-like particles or with the HPV-16 L1 gene elicits specific cytotoxic T lymphocytes in vaginal draining lymph nodes. *J Virol*. 73(11): 9063-9071.
- Eluf-Neto J, Booth M, Munõz N, Bosch FX, et al. (1994). Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. *Br J Cancer*. 69:114-119.
- Fehrmann F and Laimins LA (2003). Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*. 22: 5201-5207.
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM (2001). Globocan 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 1.0. IARC CancerBase no. 5. IARC Press: Lyon, France. International Agency for Research on Cancer.
- Ferlay J, Bray F, Pisani P (2004). Globocan 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC Cancer Base n 5 version 20 IARC Press, Lyon.
- Fernandes JV, Meissner RV, Carvalho MGF, Fernandes TAAM, et al. (2009). Prevalence of HPV infection by cervical cytologic status in Brazil. *Int J Gynecol and Obst*. 105: 21-24.
- Ferenczy A and Franco E (2002). Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol*. 3(1): 11-16.

- Ferraz OP, Leal AM, Carvalho C, Freitas AC, et al. (2003) Quercetin induces structural chromosomal aberrations and uncommon rearrangements in bovine cells transformed by the E7 protein of bovine papillomavirus type 4. *Vet Compar Oncol.* 1(1): 15-21.
- Fleury MJ, Touzé A, Alvarez E, Carpentier G, et al. (2006) Identification of type-specific and cross-reactive neutralizing conformational epitopes on the major capsid protein of human papillomavirus type 31. *Arch Virol.* 151(8): 1511-1523.
- Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A (2001). Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ.* 164(7): 1017-1025.
- Franco EL and Harper DM (2004) Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical control. *Vaccine.* 23: 2388-2394.
- Franco EL, Villa LL, Sobrinho IP, Prado JM, et al. (1999). Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high risk area for cervical cancer. *J Infect Dis.* 180(5): 1415-1423.
- Frattoni MG and Laimins LA (1994). Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci.* 91: 12398-12402.
- Gammoh N, Isaacson E, Tomaic V, Jackson DJ, et al. (2009). Inhibition of HPV 16 E7 oncogenic activity by HPV 16 E2. *Oncogene.* In press (doi: 10.1038/onc.2009.78).
- Gagnon S, Hankins C, Tremblay C, Forest P, et al. (2004). Viral polymorphism in human papillomavirus types 33 and 35 and persistent and transient infection in the genital tract of women. *J Infect Dis.* 190: 1575–1585.

- Giannoudis A and Herrington CS (2001). Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. *J Pathol.* 193: 295–302.
- Giarre M, Caldeira S, Malanchi I, Ciccolini F, et al. (2001). Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a-imposed G1 cell cycle Arrest. *J Virol.* 75: 4705–4712.
- Giroglou T, Sapp M, Lane C, Fligge C, et al. (2001). Immunological analyses of human papillomavirus capsids. *Vaccine.* 19(13–14): 1783–1793.
- Giuliano A and Palefsky J (2009). Quadrivalent HPV vaccine efficacy against male genital disease and infection. In: 25th International Papillomavirus Conference Clinical and Educational Workshop. Malmö, Sweden.
- Góes LGB, Freitas AC, Ferraz OP, Rieger TT, et al. (2008). Bovine papillomavirus type 4 L1 gene transfection in a *Drosophila* S2 cell expression system: absence of L1 protein expression. *Brazilian J Microbiol.* 39: 1-4.
- Gonçalves MA, Massad E, Burattini MN, Villa LL (1999). Relationship between human papillomavirus (HPV) genotyping and genital neoplasia in HIV-positive patients of Santos City, São Paulo, Brazil. *Int J STD AIDS.* 10: 803-807.
- Gonçalves AK, Giraldo P, Barros-Mazon S, Gondo ML, et al. (2006). Secretory immunoglobulin A in saliva of women with oral and genital HPV infection. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 124(2): 227-231.
- Gram IT, Austin H, Stalberg H (1992). Cigarette smoking and the incidence of cervical intraepithelial neoplasia, grade III. And cancer of the cervix uteri. *Am J Epidemiol.* 135(4): 341-346.
- Greenblatt RJ (2005) Human Papillomaviruses: Diseases, diagnosis, and a possible *Vaccine.* 27(18): 139-145.

Guimarães V, Guimarães R, Brandão L, Baldez da Silva MFPT, et al. (2008).

Association between *MBL2* gene functional polymorphisms and high-risk human papillomavirus infection in Brazilian women. *Human Immunology*. 69: 273–278.

Handisurya A, Schellenbacher C, Kirnbauer R (2009). Diseases caused by human papillomaviruses (HPV). *J German Soc Dermat*. 7(5): 453-466.

Harima Y, Sawada S, Nagata K, Sougawa M, et al. (2001). Polymorphism of the WAF1 gene is related to susceptibility to cervical cancer in Japanese women. *Int J Mol Med*. 7: 261–264.

Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, et al. (2004). Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet*. 364(9447): 1757-1765.

Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, et al. (2006). Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet*. 367(9518): 1247-1255.

Haverkos H, Rohrer M, Pickworth W (2000). The cause of invasive cervical cancer could be multifactorial. *Biomed Pharmac*. 54(1): 54-59.

Harwood CA and Proby CM (2002). Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer. *Curr Opin Infect Dis*. 15: 101–114.

Helt AM and Galloway DA (2001). Destabilization of the retinoblastoma tumor suppressor by human papillomavirus type 16 E7 is not sufficient to overcome cell cycle arrest in human keratinocytes. *J Virol*. 75: 6737-6747.

- Herbner CM and Laimins LA (2006). Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol.* 16(2): 83-97.
- Herrero R, Brinton LA, Reeves WC, Brenes MM, et al. (1990). Injectable contraceptive and risk of invasive cervical cancer: Evidence of an association. *Int J Cancer.* 45(1): 5-7.
- Hildestein A, Reeves WC, Brenes De, La Guardia ME, et al. (1990). Association of oral contraceptive use and human papillomaviruses in invasive cervical cancers. *Int J Cancer.* 45(5): 860-864.
- Hildesheim A, Markowitz L, Avila MH, Franceschi S (2006). Research needs following initial licensure of virus-like particle HPV vaccines. *Vaccine.* 24(3): 227-232.
- Hirayama T (1979). Epidemiology of prostate cancer with special reference to the role of diet. *Natl Cancer Int Monogr.* 53: 149-155.
- Herrington CS (1995). Human papillomaviruses and cervical neoplasia. II: Interaction with other factors. *J Clin Pathol.* 48: 1–6.
- Herrington CS (1996). Control of human papillomavirus replication: implications for squamous neoplasia. *J Pathol.* 178: 237–238.
- Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, et al. (1998). Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.* 338(7): 423–428.
- Illades-Aguilar B, Malagón EMC, Antonio-Vèjar V, Zamudio-Lòpez N, et al. (2008). Cervical carcinoma in Southern Mexico: Human papillomavirus and cofactors. *Cancer Det and Prev.* 32: 300-307.
- INCA. Instituto Nacional do Câncer: Estimativas 2008. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/>. Accessed August 22, 2009

- Inglis S, Shaw A, Koenig S (2006). HPV vaccines: Commercial Research & Development. *Vaccine*. 24(3): 99-105.
- Johnson JD, Houchens D, Kluwe WM, Craig DK, et al. (1990). Effects of the mainstream and environmental tobacco smoke on the immune system in animals e humans: a review. *Critical Rev Toxicol*. 20(5): 369-390.
- Kay P, Meehan K, Williamson AL (2002). The use of nested polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism for the detection and typing of mucosal human papillomavirus in samples containing low copy numbers of viral DNA. *J Virolog Methods*. 105: 159-170.
- Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A, Pettersen E, et al. (1996). Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *J Clinical Microbiol*. 34(9): 2095-2100.
- Kim YT and Zhao M (2005). Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma. *Yonsei Med J*. 46: 597.
- Kim SW and Yang JS (2006). Human Papillomaviruses Type 16 E5 protein as a Therapeutic Target. *Yonsei Medical Journal*. 47(1): 1-14.
- Kirnbauer R (1996). Papillomavirus-like particles for serology and vaccine development. *Intervirology*. 39: 54-61.
- Kjaer SK, Svare EI, Worm AM, Walboomers JM, et al. (2000). Human papillomavirus infection in Danish female sex workers: decreasing prevalence with age despite continuously high sexual activity. *Sex Transm Dis*. 27(8): 438-445.
- Kjaer SK, Munk C, Winther JF, Jorgensen HO, et al. (2005). Acquisition and persistence of human papillomavirus infection in younger men: a prospective follow-up study among Danish soldiers. *Cancer Epidemiol Bio Prev*. 14: 1528–1533.

- Kjellberg L, Hallmans G, Ahren AM, Johansson R, et al. (2000). Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Br J Cancer*. 82(7): 1332-1338.
- Koshiol J, Hildesheim A, Gonzalez P, Bratti C, et al. (2009). Common Genetic Variation in TP53 and Risk of Human Papillomavirus Persistence and Progression to CIN3/Cancer. *Rev Cancer Epidemiol Bio Prev*. 18: 1631.
- Koutsky LA and Harper DM (2006). Chapter 13: Current findings from prophylactic HPV vaccine trials. *Vaccine*. 24(3): 114-121.
- Koushik A, Ghosh A, Duarte-Franco E, Forest P, et al. (2005). The p53 codon 72 polymorphism and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Detect Prev*. 29: 307–316.
- Koushik A, Tranah GJ, Ma J, Stampfer MJ, et al. (2006). p53 Arg72Pro polymorphism and risk of colorectal adenoma and cancer. *Int J Cancer*. 119(8): 1863-1868.
- Knebel DM (2002). New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer*. 38(17): 2229–2242.
- Kurman RJ and Solomon DO (1997). Sistema Bethesda para o Relato de Diagnóstico Citológico Cervicovaginal. Rio de Janeiro: Revinter, 1997.
- Lajous M, Mueller N, Cruz-Valdéz A, Aguilar LV, et al. (2005). Determinants of prevalence, acquisition, and persistence of human papillomavirus in healthy mexican military men. *Cancer Epidemiol Bio Prev*. 14: 1710–1716.
- Lambert B, Boivin Y, Lepage Y (1999). Atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS): clinical cytological significance. *Int J Gynecol Cancer*. 9(4): 329-332.

- Lechmann M, Murata K, Satoi J, Vergalla J, et al. (2001). Hepatitis C virus-like particles induce virus-specific humoral and cellular immune responses in mice. *Hepatology*. 34: 417–423.
- Lehtinen M, Dillner J, Paavonen J (2001). Vaccinating women against premature death: Summary of an International Workshop, Helsinki, Finland. *Vaccine*. 19(11-12): 1347-1352.
- Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG (1998). Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res*. 74: 49–139.
- Liaw KL, Hildesheim A, Burk RD, Gravitt P, et al. (2001). A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types. *J Infect Dis*. 183: 8–15.
- Lima DNO, Câmara S, Mattos MGG, Ramalho R (2002). Diagnóstico citológico de ASCUS: sua importância na conduta clínica. *J Brás Patol Med Lab*. 38(1): 45-49.
- Lin HP, Huang YY, Wu HY, Kao JT (2004). Method for testing for human papillomavirus infection in patients with cervical intraepithelial disease. *J Clinical Microb*. 42(1): 366-368.
- Lindsey CJ, Almeida ME, Vicari CF, Carvalho C, et al. (2009). Bovine papillomavirus DNA in milk, blood, urine, semen, and spermatozoa of bovine papillomavirus-infected animals. *Gen Mol Res*. 8(1): 310-318.
- Longworth MS and Laimins LA (2004). Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev*. 68: 362–372.

- Lorenzato F, Ho L, Terry G, Singers A, et al. (2000). The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). *Int J Gynecol Cancer*. 10: 143-150.
- Lowndes CM (2006). Vaccines for cervical cancer. *Epidemiol Infect*. 134: 1–12.
- Lowy DR and Schiller JT (2006). Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest*. 116(5): 1167-1173.
- Maciag PC, Schlecht NF, Souza PS, Rohan TE, et al. (2002). Polymorphisms of the human leukocyte antigen DRB1 and DQB1 genes and the natural history of human papillomavirus infection. *J Infect Dis*. 186(2): 164–172.
- Madsen HO, Satz ML, Høgh B, Svejgaard A, et al. (1998). Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. *J Immunol*. 161: 3169–3175.
- Máire A and Duggan MD (1999). Cytologic and Histologic diagnosis and significance of controversial squamous lesions of the uterine cervix. *Long Course Pathol Uterine Corpus Cervix*. 13(3): 252-260.
- Massad LS, Einstein M, Myers E, Wheeler CM, et al. (2009). The impact of human papillomavirus vaccination on cervical cancer prevention efforts. *Gynecol Oncol*. In press (doi:10.1016/j.ygyno.2009.04.005).
- McAleer WJ, Buynak EB, Maigetter RZ, Wampler DE, et al. (1984). Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature*. 307: 178–180.
- Mendonça VG, Lorenzato FRB, Mendonça JG, Menezes TC, et al. (2008). Mortalidade por câncer do colo do útero: características sócio-demográficas das mulheres residentes na cidade de Recife, Pernambuco. *Res Bras Ginecol Obstet*. 30(5): 248-255.

- Meschede W, Zumbach K, Braspenning J, Scheffner M, et al. (1998). Antibodies against early proteins of human papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol.* 36: 475-480.
- Mendez F, Munoz N, Posso H, Molano M, et al. (2005). Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types and possible implications for the prevention of cervical cancer by HPV vaccines. *J Infect Dis.* 192: 1158–1165.
- Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Conprev. Atlas de mortalidade por câncer no Brasil 1979-99. Rio de Janeiro: INCA, 2002.
- Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL (2006). Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine.* 24(3): 42-51.
- Motoyama S, Ladines-Llave Ca, Villanueva SL, Maruo T (2004). The Role of Human Papilloma Virus in the Molecular Biology of Cervical Carcinogenesis. *Kobe J Med Sci.* 50(1): 9-19.
- Moura JW, Stocco dos Santos RC, Dagli MLZ, D'Angelino JL, et al. (1988). Chromosome aberrations in cattle raised on bracken fern pasture. *Cel Mol Life Sciences.* 44(9): 785-788.
- Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, et al. (2004). Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol.* 78: 11451–11460.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, et al. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 348(6): 518-527.
- Muñoz N, Castellsagué X, González AB, Gissmann L (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine.* 24(3): 1-10.

- Murphy FA, Fauquet CM, Mayo MA, Jarvis AW, et al. (1995). The classification and nomenclature of viruses. "Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses". Archives of Virology, Springer Verlag, New York, 586p.
- Nadal LRM and Nadal SR (2008). Indicações da vacina contra o papilomavirus humano. *Res Bras Colproct.* 28(1): 124-126.
- Nepom GT and Erlich H (1991). MHC class II molecules and autoimmunity. *Annu Rev Immunol.* 9: 493-525.
- Nguyen HH, Broker TR, Chow LT, Alvarez RD, et al. (2005). Immune responses to human papillomavirus in genital tract of women with cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 96: 452-461.
- NMA(2007)<http://catalog.nucleusinc.com/chooseexhibit.php?A=2&I=2&TL=1793&ExhibitKeywords=cervical+cancer>. Accessed August 15, 2007.
- Noronha V, Mello W, Villa LL, Macedo R, et al. (1999). Human papillomavirus associated with uterine cervix lesions. *Rev Soc Bras Med Trop.* 32: 235-240.
- Oriel JD (1971). Natural history of genital warts. *Br J Vener Dis.* 47: 1–13.
- Orozco JJ, Carter JJ, Koutsky LA, Galloway DA (2005). Humoral immune response recognizes a complex set of epitopes on human papillomavirus type 6 l1 capsomers. *J Virol.* 79(15): 9503–9514.
- Ogawa T, Tomita Y, Okada M, Shinozaki K, et al. (2004). Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. *J Gen Virol.* 85: 2191-2197.
- Oliveira DE (2006). DNA viruses in human cancer: an integrated overview on fundamental mechanisms of viral carcinogenesis. *Cancer Letters.* 247(2): 182-196.

- Oliveira-Ferreira J, Myahira Y, Layton GT, Savage N, et al. (2000). Immunogenicity of Ty-VLP bearing a CD8(+) T cell epitope of the CS protein of *P. yoelii*: enhanced memory response by boosting with recombinant vaccinia virus. *Vaccine*. 18:1863–1869.
- Ozbun M (2002). Infectious human papillomavirus type 31b: purification and infection of an immortalized human keratinocyte cell line. *J Gen Virol*. 83: 2753-2763.
- Palker TJ, Monteiro JM, Martin MM, Kakareka C, et al. (2001). Antibody, cytokine and cytotoxic T lymphocyte responses in chimpanzees immunized with human papillomavirus virus-like particles. *Vaccine*. 19: 3733-3743.
- Parkin DM and Bray F (2006). The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*. 24(3): 11-25.
- Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, et al. (1997). Cancer incidence in five continents. IARC Scientific Publication No. 143. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- Pérez-López FR (2003). Virus del papiloma, condilomas verrugosos, CIN, SIL y cancer genital. Gine Web Ginecologia www.unizar.es/gine/gin301.htm.
- Popp R and Schimmer O (1991). Induction of sister-chromatid exchanges (SCE), polyploidy, and micronuclei by plant flavonoids in human lymphocyte cultures. A comparative study of 19 flavonoids. *Mut Res*. 246(1): 205-213.
- Pfister H (2003) Human papillomavirus and skin cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 31:52–6.
- Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP, et al. (2003). Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical câncer from Goiânia, Brazil. *Mem Ins Oswaldo Cruz*. 98(2): 181-184.

- Rama C, Roteli-Martins C, Derchain SFM, Longato-Filho A, et al. (2008). Previous screening for cervical câncer in women with histological or cytological alterations. *Rev Saúde Pública*. 42(3): 411-419.
- Rambout L, Hopkins L, Hutton B, Fergusson D (2007). Prophylactic vaccination against human papillomavirus infection and disease in women: a systematic review of randomized controlled trials. *CMAJ*. 177(5): 469.
- Ramoz N, Rueda LA, Bouadjar B, Montoya LS, et al. (2002). Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis. *Nat Genet*. 32: 579–581.
- Rau B, Sturm I, Lage H, Berger S, et al. (2003). Dynamic expression profile of p21WAF1/CIP1 and Ki-67 predicts survival in rectal carcinoma treated with preoperative radiochemotherapy. *J Clin Oncol*. 21: 3391–3401.
- Recouso RC, Stocco dos Santos RC, Freitas R, Santos RC, et al. (2003). Clastogenic effect of bracken fern (*Pteridium aquilinum* v. *arachnoideum*) diet in peripheral lymphocytes of human consumers: preliminary data. *Vet Compar Oncol*. 1(1): 22-29.
- Roden RBS and Wu TC (2004). Vaccination to prevent and treat cervical cancer. *Human Pathology*. 35(8): 971-982.
- Rosenblatt C, Wroclawski ER, Lucon AM, Pereyra EAG (2005). HPV na prática clínica. Ed. Atheneu, 1^a ed., p.286.
- Roos A, Bouwman LH, van Gijlswijk-Janssen DJ, Faber-Krol MC, et al. (2001). Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway. *J Immunol*. 167(5): 2861-2868.

- Rousseau MC, Pereira JS, Prado JC, Villa LL, et al. (2001). Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types as a predictor of acquisition and persistence of HPV infection. *J Infect Dis.* 184: 1508–1517.
- Sadjadi A, Malekzadeh R, Derakhshan MH, Sepehr A, et al. (2003). Cancer occurrence in Ardabil. Results of a population-based cancer registry from Iran. *Int J Cancer.* 107(1): 113–118.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2 ed.
- Sanjose S, Almirall R, Lloveras B, Font R, et al. (2003). Cervical human papillomavirus infection in the female population in Barcelona, Spain. *Sex Transm Dis.* 30(10): 788-793.
- Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K (2005). Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer.* 15: 727-746.
- Schiller JT and Nardelli-Haeffliger D (2006). Second generation HPV vaccines to prevent cervical cancer. *Vaccine.* 24(3): 147-153.
- Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, et al. (2001). Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA.* 286: 3106-3114.
- Segat L, Milanese M, Fabris A, Crovella S, et al. (2009). *MBL2* gene functional polymorphisms are correlated with high risk HPV infection but not with HPV-related cervix cancer. *Human Immunology.* In press.
- Shahin R, Johnson IL, Jamieson F, McGeer A, et al. (1999). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carriage in a Child Care Center Following a Case of Disease. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 153(8): 864-868.

- Silva AMT, Amaral MVT, Cruz AD (2003). HPV e Câncer: O papel do papiloma vírus humano na carcinogênese. *Biotechnol Ciênc Desenvol.* 29: 48-54.
- Sjalander A, Birgander R, Kivela A, Beckman G (1995). p53 polymorphisms and haplotypes in different ethnic groups. *Hum Hered.* 45: 144–149.
- Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, et al. (2002). The 2002 System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA.* 287(16): 2114-2119.
- Souto MAM, Kommers GD, Barros CSL, Piazer JVM, et al. (2006). Neoplasias do trato alimentar superior de bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilium*). *Pesq Vet Bras.* 26(2): 112-122.
- Stanczuk GA, Sibanda EN, Perrey C, Chirara M, et al. (2001). Cancer of the uterine cervix may be significantly associated with a gene polymorphism coding for increased IL-10 production. *Int J Cancer.* 94: 792–794.
- Stanley MA (2001). Human papillomavirus and cervical carcinogenesis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynecol.* 15(5): 663-676.
- Stanley M, Lowy DR, Frazer I (2006). Prophylactic HPV vaccines: Underlying mechanisms. *Vaccine.* 24(3): 106-113.
- Stewart AC, Eriksson AM, Manos MM, Munoz N, et al. (1996). Intratype variation in 12 human papillomavirus types: a worldwide perspective. *J Virol.* 70: 3127–3136.
- Stocco dos Santos RC, Lindsey CJ, Ferraz OP, Pinto JR, et al. (1998). Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: an experimental model. *J Gen Virology.* 79: 2127-2135.

- Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, et al. (1998). Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus- associated cancer. *Nature*. 393(6682): 229-234.
- Suzich JA, Ghim SJ, Palmer-Hill FJ, White WI, et al. (1995). Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92: 1553–1557.
- Szalmás A and Kònya J (2009). Epigenetic alterations in cervical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*. 19: 144-152.
- Tacket CO, Sztein MB, Losonsky GA, Wasserman SS, et al. (2003). Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles in volunteers. *Clin Immunol*. 108: 241–247.
- Thomas M, Pim D, Banks L (1999). The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*. 18: 7690–7700.
- Thomas M, Laura R, Hepner K, Guccione E, et al. (2002). Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and Magi-3 proteins for degradation. *Oncogene*. 21(33): 5088-5096.
- Torpy JM, Burke AE, Glass LM (2007). Human Papillomavirus Infection. *J Am Med Ass*. 297(8): 912.
- Tovar JM, Bazaldua OV, Vargas L, Reile E (2008). Human papillomavirus, cervical cancer and the vaccines. *Posgraduate Medicine*. 120(2): 79-84.
- Trottier H and Franco EL (2006). The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 24(1): 4-15.
- Tsai TC and Chen SL (2003). The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. *Arch Virol*. 148: 1445-1453.

- Tsao YP, Li LY, Tsai TC, Chen SL (1996). Human papillomavirus type 11 and 16 E5 represses p21 (Waf1/Sd1/Cip1) gene expression in fibroblasts and keratinocytes. *J Virol.* 70: 7535-7539.
- Van der Bung SH, Kwappenberg KM, Neile TO, Brandt RMP, et al. (2001). Pre-clinical safety and efficacy of TA-CIN, a recombinant HPV16 L2E6E7 fusion protein vaccine, in homologous and heterologous prime-boost regimens. *Vaccine.* 19(27): 3653-3660.
- van der Graaf Y, Molijn A, Doornewaard H, Quint W, et al. (2002). Human papillomavirus and the long-term risk of cervical neoplasia. *Am J Epidemiol.* 156: 158-164.
- van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Cartens EB, et al. (2000). Virus Taxonomy: The classification and nomenclature of viruses. The seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego. Academic Press, 1176p.
- Villa LL (1999). Molecular variability of Human papillomavirus and susceptibility to cervical neoplasia. *J Braz Assoc Adv Science.* 51: 212-217.
- Vlahos NP, Dragisic KG, Wallach EE, Burroughs FH, et al. (2000). Clinical significance of the qualification of atypical squamous cells of undetermined significance: an analysis on the basis of histologic diagnoses. *Am J Obstet Gynecol.* 182(4): 885-890.
- Xu YF, Zhang YQ, Xu XM, Song GX (2006). Papillomavirus virus-like particles as vehicles for the delivery of epitopes or genes. *Arch Virol.* 151: 2133-2148.
- Wang SS and Hildesheim A (2003). Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 31: 35–40.

- Wang SS, Zuna RE, Wentzensen N, Dunn ST, et al. (2009). Human papillomavirus cofactors disease progression and human papillomavirus types in the study to understand cervical cancer early endpoints and determinants. *Cancer Epidemiol Bio Prev.* 18(1): 113-120.
- Wang Q, Jackson D, Doonbar J (2009). E1 E4 contributes to HPV genome amplification but is not essencial. In: 25th International Papillomavirus Conference Clinical and Educational Workshop. Malmö, Sweden.
- Wank R and Thomssen C (1991). High risk of squamous cell carcinoma of the cervix for women with HLA-DQw3. *Nature.* 352: 723–725.
- Weaver BA (2006). Epidemiology and natural history of genital human papillomavirus infection. *J Am Osteopath Assoc.* 106(3): 2-8.
- Wentzensen N, Bergeron C, Cas F, Eschenbach D, et al. (2005). Evaluation of a nuclear score for p16INK4a-stained cervical squamous cells in liquid-based cytology samples. *Cancer.* 105(6): 461–467.
- Wentzensen N, Schiffman M, Dunn ST, Zuna RE, et al. (2009). Grading the severity of cervical neoplasia based on combined histopatology, cytopatology, and HPV genotype distribution among 1,700 women referred to colposcopy in Oklahoma. *Int J Cancer.* 124: 964-969.
- Whelan SL, Parkin DM, Masuyer ESL (1991). Patterns of Cancer Incidence in Five Continents. *Cancer Causes Control.* 2(2): 141.
- Wood D, Shin J, Duval B, Schmitt H (2006). Assuring the quality, safety and efficacy of HPV vaccines: The scientific basis of regulatory exceptions pre- and post-licensure. *Vaccine.* 24(3): 187-192.
- Woodman CBJ, Collins SI, Young LS (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews.* 7(1): 11-22.

World Health Organization

<http://www.who.int/healthinfo/statistics/bodprojections2030/en/index.html>.

Accessed August 15, 2007.

Wood D, Shin J, Duval B, Schmitt H (2006). Assuring the quality, safety and efficacy of HPV vaccines: The scientific basis of regulatory expectations pre- and post-licensure. *Vaccine*. 24(3): 187-192.

Wright TC, Bosch FX, Franco EL, Cuzick J, et al. (2006). HPV vaccines and screening in the prevention of cervical cancer; conclusions from a 2006 workshop of international experts. *Vaccine*. 24(3): 251-261.

Wu X, Levine AJ (1994). p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc Natl Acad Sci*. 91: 3602-3606.

Viahos NP, Dragisic KG, Wallach EE, Burroughs FH, et al. (2000). Clinical significance of the qualification of atypical squamous cells of undetermined significance: an analysis on the basis of histologic diagnoses. *Am J Obstet Gynecol*. 182(4): 885-890.

Xin CY, Matsumoto K, Yoshikawa H, Yasugi T, et al. (2001). 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 Lett*. 170: 19-24.

Xu YF, Zhang YQ, Xu XM, Song GX (2006). Pappiloma virus-like particles as vehicles for the delivery of epitopes or genes. *Arch Virol*. 151: 2133-2148.

Yalti S, Gurbuz B, Bilgic R, Cakar Y, et al. (2005). Evaluation of cytologic screening results of the cervix. *Int J Gynecol Cancer*. 15(2): 292-294.

- Yarandi F, Izadi Mood N, Mirashrafi F, Eftekhari Z (2004). Colposcopic and histologic findings in women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. *Aust N Z J Obstet Gynecol.* 44(6): 514-516.
- Zimmerman, RK (2006). Ethical analysis of HPV vaccine policy options. *Vaccine.* 24: 4812-4820.
- Zehle I, Voglino G, Wilander E, Genta F, et al. (1999). Codon 72 polymorphism of p53 and its association with cervical cancer. *Lancet.* 354: 218-219.
- Zheng ZM and Baker CC (2006). Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* 11: 2286–2302.
- zur Hausen H (2000). Papillomaviruses causing cancer: evasion from host cell control in carcinogenesis. *J Nat Cancer Institute.* 92(9): 690-698.
- zur Hausen H (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2(5): 342-350.
- zur Hausen H (2006). Perspectives of contemporary papillomavirus research. *Vaccine.*

9. Anexos

9.1. Artigo 01



Association between *MBL2* gene functional polymorphisms and high-risk human papillomavirus infection in Brazilian women

Vilma Guimaraes^a, Rafael Guimaraes^b, Lucas Brandao^b,
Maria Fernanda Piffer Tomasi Baldez da Silva^c, Michele Milanese^d,
Ludovica Segat^{d,*}, Henrique Castelletti^b, Danielly Brunaska^b,
José Luiz de Lima Filho^b, Antonio Carlos de Freitas^c, Luiz Claudio Arraes^d,
Cintia Rocha^b, Sergio Crovella^{c,e}

^a Gynecological Unit, Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira, Recife, Brazil

^b Laboratório de Imunopatologia "Keizo Azami," Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

^c Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

^d Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira, Recife, Brazil

^e Genetic Service IRCCS Burlo Garofolo and Department of Reproductive and Developmental Sciences, University of Trieste, Trieste, Italy

Received 6 January 2008; received in revised form 27 February 2008; accepted 4 March 2008

KEYWORDS

MBL2;
High- and low-risk HPV
genotypes;
Genetic
polymorphisms;
Cervical uterine
cancer;
Brazilian women;
Innate immunity

Summary We studied the association between high-risk human papillomavirus (HPV) infection and *MBL2* functional polymorphisms in a group of 180 high-risk HPV-infected women and 180 healthy control subjects. The most frequent high-risk HPV genotypes were 16 (47.2%), 31 (11.7%), 33 (5%), and 18 (2.2%), respectively. Of the 180 HPV-infected women, 99 presented with uterine cervical cancer and 81 did not. No differences in *MBL2* genotype or in allelic or haplotype frequencies were found between HPV patients who developed cervical uterine cancer and those who did not. When considering combined genotypes grouped according to *MBL* production (designated as high, low, and deficient producers), we detected a significant difference between healthy controls and high-risk HPV-positive patients, the latter group showing increased frequencies of deficient-producer genotypes (14.4% vs 9.4% in the healthy control group, corrected $p = 0.04$). In conclusion, a correlation between *MBL2* polymorphisms and high-risk HPV infection was found in this study.

© 2008 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

* Corresponding author. Fax: +39.040.3785540.

E-mail address: segat@burlo.trieste.it (L. Segat).

ABBREVIATIONS

ASCUS	atypical squamous cells of undetermined significance
DP	deficient producer (of mannose-binding lectin)
HP	high producer (of mannose-binding lectin)
HPV	human papillomavirus
HSIL	high-grade squamous intraepithelial lesions
IgA	immunoglobulin A
LP	low producer (of mannose-binding lectin)
LSIL	low-grade squamous intraepithelial lesions
MBL	mannose-binding lectin
PCR	polymerase chain reaction
SIL	squamous intraepithelial lesions
SNP	single nucleotide polymorphism

Introduction

Squamous cell carcinoma is, after melanoma, the second most frequent form of skin cancer. Among its causes, chronic infection by the human papillomavirus (HPV) has been demonstrated to be one of the principal risk factor for the development of its gynecologic form [1]. In fact, a direct transforming effect of HPV has been identified and has been correlated with a direct interaction of the virus with the oncosuppressor p53 gene [2].

One of the reasons for the pathogenicity of HPV is that the virus is able to use a large array of techniques to evade the host immune system. For example HPV gene expression and virus release occur in superficial squamous cells, where the virus antigens are not readily detected; moreover keratinocytes are not lysed during HPV replication, and therefore inflammatory response is lacking. Finally, HPV early proteins are able to directly inhibit specific components of the innate immune system: the E6 and E7 viral proteins inhibit signaling by type I interferons and decrease the expression of multiple interferon-inducible genes [3] and the E5 and E7 proteins hamper expression of major histocompatibility complex class I proteins on the cell surface.

Although HPV-infected cells are sensitive to cytokine-activated natural killer cells, and activated macrophages are able to kill HPV-infected cells to control malignant development [4], the innate immune system, which provides nonspecific protection against a variety of pathogens, represents the first line of defense against HPV and consequently plays an important role in the control of infection.

An important component of the innate immune system is the mannose-binding lectin (MBL), a plasma glycoprotein that is synthesized mainly in the liver [5]. MBL is capable of binding patterns of carbohydrate moieties predominantly present on the surface of microorganisms (including bacteria, viruses, and fungi) and activating the complement system; it can also promote complement-independent opsonophagocytosis, modulate inflammation, and endorse apoptosis [6-8]. Moreover it has recently been shown that MBL can also activate the lectin pathway of complement system by binding to immunoglobulin A (IgA) [9].

Three major mutant alleles in exon 1 of the *MBL2* gene (at codons 52, 54, and 57), as well as polymorphisms in the promoter region of the gene, have been associated with reduced levels of serum MBL [10]. Although mutations in the promoter are likely to directly reduce MBL expression by impeding the binding of transcription factors, polymorphisms in the first exon prevent the correct oligomerization of MBL chains and cause the formation of a defective form of the protein [11,12].

MBL deficiency has been shown to be associated with increased susceptibility to many infectious diseases (for review, see [8,13]). Several reports suggest that MBL can also modulate the disease severity and can be used as a marker to predict the therapeutic efficacy in some disorders, such as the response to interferon treatment in patients with chronic hepatitis C [14]. To our knowledge only one recent paper has investigated a possible correlation between *MBL2* functional polymorphisms and susceptibility to HPV infection, reporting negative findings and the lack of an association [15].

In our study we analyzed functional polymorphisms in the promoter and in the first exon of the *MBL2* gene in women infected by high-risk HPV (some of whom developed cervical uterine cancer while others remained free of tumor) and in a control population not infected by HPV (neither low- nor high-risk genotypes) and without cancer. The study aim was to correlate *MBL2* polymorphisms with host susceptibility to infection by high-risk HPV. Because it has been shown that MBL can activate the complement system by binding to IgA and because several reports have described a correlation among IgA levels, HPV infection, and disease progression [16-18], we hypothesized that mutation in *MBL2* gene could be responsible for different interindividual immune responses and could explain part of the susceptibility to high-risk HPV infection.

Subjects and methods

Patients and samples

A total of 213 women (median age 23 years, range 18-35, interquartile range 20-27), positive for high-risk HPV genotypes were enrolled at the gynecologic day hospital of the Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira (IMIP). Patients were admitted in the study when found positive for multiple HPV testing in a 3-year period, to ensure that the infection was persistent. Of the 213 women originally enrolled, 33 (15%) were excluded from the study because of co-infection with high- or low-risk HPV genotypes.

In addition 180 healthy women (median age 25 years, range 18-39, interquartile range 21-30) with no evidence of HPV were enrolled as healthy control subjects. These subjects were admitted to the hospital for standard gynecologic controls and underwent cervical screening to ensure the absence of HPV infection. Moreover the presence of HPV was double checked by using polymerase chain reaction (PCR) and the HPV-specific L1 primers MY09-MY11. From an original population of 250 healthy women with normal Papanicolaou test, 70 women, after PCR testing, were found to be infected with HPV and were excluded from the study.

Both patients and control subjects were from the Recife metropolitan area and were known not to carry the most common risk factors for HPV infection: all subjects were nonsmokers and had only one partner based on data collected by questionnaire. Diagnosis of cervical cancer and identification of lesions such as squamous intra-

epithelial lesions (SIL) were histologically confirmed. Biopsy specimens were embedded in paraffin, and 6–8-mm tissue slices were stained with hematoxylin and eosin using standard criteria. Histologic slides were evaluated by different pathologists.

The significance of the study was explained to the patients, and informed consent was obtained. The study was approved by the Ethical Committee of the IMIP.

DNA extraction

Genomic DNA for MBL2 genotyping was extracted from peripheral whole blood using the GenomePrep extraction kit (Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, UK) according to standard procedures.

MBL2 genotyping

Two promoter polymorphisms, G-550C (rs11003125, known as H/L variant) and G-221C (rs7096206, known as X/Y variant), were tested with TaqMan assays according to the method of Baccarelli *et al.* [19].

Moreover we genotyped three MBL2 polymorphisms located in the first exon at codons 52 (rs5030737), 54 (rs1800450), and 57 (rs1800451). These three variant alleles were grouped together in one category (allele O), because they have a similar functional effect on MBL, impeding a correct formation of oligomers, as indicated by Larsen *et al.* [12], whereas the combination of three wild type alleles were grouped as allele A as suggested by Garred *et al.* [20]. Exon-1 MBL2 single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping was performed by Melting Temperature Assay as previously described [21], using the ABI 7900 (Applied Biosystems, Foster City, CA) real-time PCR platform.

Both haplotypes and combined genotypes were also computed; these were indicated using common nomenclature in which the first two letters show the variant of the polymorphism in the promoter region, (alleles H/L and X/Y) and the third letter indicates the combination of the three polymorphisms in exon 1 (alleles A/O).

HPV genotyping

HPV DNA typing by cervical brush was performed as follows. Swabs were collected into 5-ml sterile phosphate-buffered saline PBS tubes and stored at –20°C before handling. Samples were thawed and strongly vortexed to discharge cellular material from the brush according to the procedures described by Luxton *et al.* [22]. DNA was extracted with the GenomePrep extraction kit (Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, UK), and HPV genotyping was performed by using the AlphaStrip HPV kit (Alphagenics-Diaco, Trieste, Italy) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Allele and genotype frequencies were calculated by direct gene counting. Fisher's exact test was used for pairwise comparison of genotype frequencies using 2×2 and 3×2 contingency tables and to test for Hardy-Weinberg equilibrium. Haplotypes data were obtained with PHASE software [23] (downloadable at http://depts.washington.edu/ventures/UW_Technology/Express_Licenses/PHASEv2.php) by assuming complete linkage disequilibrium between the tested loci, as previously demonstrated [24]. To avoid false-positive results, *p* value correction for multiple observations was performed with the Bonferroni method.

Table 1 Allelic and genotype frequency distribution of MBL2 exon 1 and promoter polymorphisms in high-risk human papillomavirus (HPV)-infected women, developing or not developing cervical uterine cancer, and healthy controls.

MBL2 polymorphism	hrHPV		Total	HC
	hrHPV/CUC	hrHPV/NoCUC		
Exon-1 A/O SNP				
A	142 (71.7)	120 (74.1)	262 (72.8)	293 (81.4)
O	56 (28.3)	42 (25.9)	98 (27.2)	67 (18.6)
A/A	48 (48.5)	45 (55.6)	93 (51.7)	117 (65)
A/O	46 (46.5)	30 (37)	76 (42.2)	59 (32.8)
O/O	5 (5)	6 (7.4)	11 (6.1)	4 (2.2)
Prom. X/Y SNP				
X	65 (32.8)	56 (34.6)	121 (33.6)	135 (37.5)
Y	133 (67.2)	106 (65.4)	239 (66.4)	225 (62.5)
X/X	13 (13.1)	10 (12.4)	23 (12.8)	31 (17.2)
X/Y	39 (39.4)	36 (44.4)	75 (41.7)	73 (40.6)
Y/Y	47 (47.5)	35 (43.2)	82 (45.5)	76 (42.2)
Prom. H/L SNP				
H	133 (67.2)	116 (71.6)	249 (69.2)	257 (71.4)
L	65 (32.8)	46 (28.4)	111 (30.8)	103 (28.6)
H/H	42 (42.4)	43 (53.1)	85 (47.2)	94 (52.2)
H/L	49 (49.5)	30 (37)	79 (43.9)	69 (38.3)
L/L	8 (8.1)	8 (9.9)	16 (8.9)	17 (9.5)

Data are numbers with percentages in parentheses.

HPV = human papillomavirus; hrHPV = high-risk HPV-infected women; hrHPV/CUC = high-risk HPV-infected women developing cervical uterine cancer; hrHPV/noCUC = women infected by high-risk HPV not developing cancer; HC = healthy controls.

Corrected *p* > 0.05 for all comparisons.

Table 2 *MBL2* combined genotypes considering both exon-1 and promoter variants.

MBL2 combined genotypes	hrHPV		Total	HC
	hrHPV/CUC	hrHPV/noCUC		
High producer				
HYA/HYA	31 (31.3)	29 (35.8)	60 (33.3)	87 (48.3)
HYA/LYA				
HYA/LXA				
LYA/LXA				
Low producer				
LXA/LXA	54 (54.6)	60 (49.4)	94 (52.2)	76 (42.2)
HYA/O				
LYA/O				
Deficient producer				
LXA/O	14 (14.1)	12 (14.8)	26 (14.5) ^a	17 (9.5) ^a
O/O				

Data are numbers with percentages in parentheses.

hrHPV = high-risk HPV-infected women; hrHPV/CUC = high-risk HPV-infected women developing cervical uterine cancer; hrHPV/noCUC = women infected by high-risk HPV not developing cancer; HC = healthy controls.

The resulting genotypes were ranked according to MBL production into three classes designated as high, low, and deficient producers.

^a Corrected $p = 0.04$, deficient producer genotype hrHPV vs HC; corrected $p > 0.05$ for all other comparisons.

Results

In the present study we looked for relationship between functional polymorphisms in the *MBL2* gene and host susceptibility to high-risk HPV infection and cancer development in a population of Brazilian woman. We genotyped two promoter and the exon 1 *MBL2* polymorphisms in 180 healthy women and 180 high-risk HPV-infected women, further subdivided into 99 patients who had developed cervical uterine cancer and 81 patients who did not have evidence of cancer but did have atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS; 18/81), low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL; 43/81), or high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL; 20/81).

Type-specific virus genotyping in high-risk HPV-infected women showed that HPV-16 was the most frequently represented type (85/180; 47.2%), followed by HPV-31 (21/180; 11.7%), HPV-33 (9/180; 5%), and HPV-18 (4/180; 2.2%). Of the patients, 61 (33.9%) presented with multiple high-risk genotype infections.

Table 1 summarizes the genotypic and allelic frequencies of the two most common promoter polymorphisms (G-550C, known as H/L variant; and G-221C, known as X/Y variant) and three functional polymorphisms at codons 52, 54, and 57 in the first exon of the *MBL2* gene in high-risk HPV-infected women and healthy controls. Both high-risk HPV-infected women and healthy controls were in Hardy-Weinberg equilibrium for every polymorphism studied.

Genotype and allelic frequencies of the H/L and X/Y variants were not different between high-risk HPV-infected women who developed cancer and those characterized by other features (LSIL, HSIL, or ASCUS) as well as the healthy controls, when assessed by Fisher's exact test. When considering polymorphisms in the first exon of *MBL2* gene, high-risk HPV-infected women showed an increased frequency of the O allele and of the O/O genotype, although the difference does not retain its statistical significance (uncorrected $p <$

0.01 and <0.02 , respectively) after p value correction for multiple testing (corrected $p > 0.05$). No difference in polymorphism frequencies could be discerned between high-risk HPV-infected patients who developed cervical uterine cancer and those who did not.

In our study we also evaluated *MBL2* haplotypes in both high-risk HPV-infected women and controls. The polymorphisms studied were in linkage disequilibrium, and only five of the eight possible hypothetical haplotypes were observed.

In addition we computed combined genotypes (Table 2) and ranked them in three classes accordingly to MBL production, designated as high producers (HPs), low producers (LPs), and deficient producers (DPs) [25]. The frequency of combined genotypes was evaluated with the aim of estimating the effects of functional haplotypes on the susceptibility to HPV infection in the groups of patients and controls studied. We were able to detect a significant difference between healthy controls and high-risk HPV-positive patients, with the latter group presenting increased frequencies of DPs (14.4% vs 9.4% in the healthy controls, corrected $p = 0.04$).

Again, there was no detectable difference among the high-risk HPV-infected patients developing cervical uterine cancer and those who did not.

Discussion

Our results lead us to the conclusion that susceptibility to high-risk HPV infection is influenced by *MBL2* functional polymorphisms and, more precisely, by the deficient producer (DP) genotypes, associated with a considerable lack of MBL ($\leq 1\%$ of functional protein is produced). High-risk HPV-positive patients had increased frequencies of DP haplotypes when compared with the healthy controls (14.4% vs 9.4% respectively, corrected $p = 0.04$).

A p value of 0.04, even if significant, does not indicate a strong difference between high-risk HPV-infected patients and controls; thus *MBL2* functional polymorphisms can be

considered as susceptibility factors only in the context of a multifactorial condition such as HPV infection and not as the only causative factors.

Our findings are not in agreement with those obtained by Parrella *et al.* [15], who did not find any correlation between genetic variants in the *MBL2* gene and susceptibility to HPV infection. It should be noted, however, that Parrella *et al.* analyzed a group of patients with a different ethnic background (Caucasian) from our study population (Brazilian) and that their *MBL2* genotype and allelic frequencies were quite different from those reported in the NCBI database for the Caucasian population. The Brazilian Northeastern population from Recife whom we enrolled for this study was reported to be derived from a mixture of African, Caucasian, and Native American populations estimated respectively at 44%, 34%, and 22% [26].

Moreover the frequencies that Parrella *et al.* reported were not in Hardy Weinberg equilibrium for some of the SNPs analyzed and, as a consequence, *MBL2* haplotypes were not fully considered because those SNPs were excluded from the analysis.

In the work of Parrella *et al.*, the absence of a functional classification of *MBL2* combined genotypes according to MBL protein production (DP, LP, and HP groups) [25] could also explain the differences between their negative findings and our positive ones. Nonetheless our results demonstrate an association between *MBL2* SNPs and susceptibility to HPV infection only when considering combined functional genotypes; if taken individually, each single *MBL2* polymorphism does not account for any increased or decreased susceptibility to HPV infection, similarly to the findings reported by Parrella *et al.*

When we try to elucidate the association of *MBL2* DP genotypes with an increased susceptibility to HPV infection, we must bear in mind that HPV is a nonenveloped virus, and it is not known whether MBL can directly interact with it, as occurs for other enveloped viruses. Moreover, to our knowledge, no experimental data are available concerning MBL and HPV interaction.

A possible explanation for our findings is that MBL is able to activate the lectin pathway of complement system by binding to IgA [9], and many works have underscored the role that IgA can play in HPV infection. Gonçalves *et al.* [18] demonstrated that patients characterized by low levels of total secreted IgA were significantly more susceptible to HPV colonization in their oral and genital mucosa. Nguyen *et al.* [16] and Bieri *et al.* [17] also reported a correlation between low IgA levels and an increased susceptibility to HPV infection.

We can hypothesize that the reduction of active MBL circulating protein, as a consequence of the presence of the DP *MBL2* genotype, could result in a lower binding of MBL to specific IgA against HPV, thus limiting complement activation and favouring HPV spread and disease evolution. However this is simply a hypothesis because, to our knowledge, no studies on the binding of HPV-specific IgA to MBL have yet been performed.

The absence of significant differences in *MBL2* frequencies between high-risk HPV-infected women and women who did not develop cancer but who were characterized by ASCUS, LSIL, or HSIL favors the hypothesis of an MBL involvement in the first phase of HPV infection, whereas the devel-

opment of cancer is associated with other genetic factors not related to the innate immunity and the first line of host defense.

Furthermore, in our study we considered only high-risk HPV infection because we were working with patients who had cervical uterine cancer known to be related to high-risk HPV infection. However we can hypothesize that *MBL2* functional polymorphisms can interfere with any kind of HPV (including high-, medium-, and low-risk genotypes) during the first phase of infection.

All things considered, it would be advisable to further investigate the possible role of MBL protein in the initial steps of infection, given that innate immunity remains a crucial target in assessing individual susceptibility to infections.

Acknowledgments

This study was supported by grants from FACEPE (BFP-0013-4.01/06) and from the Italian Ministry of Health (RC 03/04). L.S. is the recipient of a postdoctoral fellowship from IRCCS Burlo Garofolo.

References

- [1] Lillo FB. Human papillomavirus infection and its role in the genesis of dysplastic and neoplastic lesions of the squamous epithelia. *New Microbiol* 2005;28:111.
- [2] Kim YT, Zhao M. Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma. *Yonsei Med J* 2005;46:597.
- [3] Barnard P, McMillan NA. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon- α . *Virology* 1999;259:305.
- [4] Routes JM, Morris K, Ellison MC, Ryan S. Macrophages kill human papillomavirus type 16 E6-expressing tumor cells by tumor necrosis factor α - and nitric oxide-dependent mechanisms. *J Virol* 2005;79:116.
- [5] Medzhitov R, Janeway CJ. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000;343:338.
- [6] Jack DL, Klein NJ, Turner MW. Mannose-binding lectin: Targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. *Immunol Rev* 2001;180:86.
- [7] Kilpatrick DC. Mannan-binding lectin: Clinical significance and applications. *Biochim Biophys Acta* 2002;1572:401.
- [8] Turner MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol* 2003;40:423.
- [9] Roos A, Bouwman LH, van Gijlswijk-Janssen DJ, Faber-Krol MC, Stahl GL, Daha MR. Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway. *J Immunol* 2001;167:2861.
- [10] Madsen HO, Garred P, Thiel S, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, Svejgaard A. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol* 1995;155:3013.
- [11] Terai I, Kobayashi K, Matsushita M, Miyakawa H, Mafune N, Kikuta H. Relationship between gene polymorphisms of mannose-binding lectin (MBL) and two molecular forms of MBL. *Eur J Immunol* 2003;33:2755.
- [12] Larsen F, Madsen HO, Sim RB, Koch C, Garred P. Disease-associated mutations in human mannose-binding lectin compromise oligomerization and activity of the final protein. *J Biol Chem* 2004;279:21302.

- [13] Eisen DP, Minchinton RM. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2003;37:1496.
- [14] Matsushita M, Hijikata M, Ohta Y, Iwata K, Matsumoto M, Nakao K, et al. Hepatitis C virus infection and mutations of mannose-binding lectin gene MBL. *Arch Virol* 1998;143:645.
- [15] Parrella P, Seripa D, Matera MG, Rinaldi M, Signori E, Gravina C, et al. Lack of association between genetic variants in the mannose-binding lectin 2 (MBL2) gene and HPV infection. *Eur J Epidemiol* 2007;22:159.
- [16] Bieri C, Karem K, Poon AC, Swan D, Tortolero-Luna G, Follen M, et al. Correlates of cervical mucosal antibodies to human papillomavirus 16: Results from a case control study. *Gynecol Oncol* 2005;99:S262.
- [17] Nguyen HH, Broker TR, Chow LT, Alvarez RD, Vu HL, Andrasi J, et al. Immune responses to human papillomavirus in genital tract of women with cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2005;96:452.
- [18] Gonçalves AK, Giraldo P, Barros-Mazon S, Gondo ML, Amaral RL, Jacyntho C. Secretory immunoglobulin A in saliva of women with oral and genital HPV infection. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006;124:227.
- [19] Baccarelli A, Hou L, Chen J, Lissowska J, El-Omar EM, Grillo P, et al. Mannose-binding lectin-2 genetic variation and stomach cancer risk. *Int J Cancer* 2006;119:1970.
- [20] Garred P, Madsen HO, Balslev U, Hofmann B, Pedersen C, Gerstoft J, et al. A. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. *Lancet* 1997;349:236.
- [21] Milanese M, Segat L, De Seta F, Pirulli D, Fabris A, Morgutti M et al. MBL2 genetic screening in patients with recurrent vaginal infections. *Am J Repr Immunol* 2008;59:146.
- [22] Luxton JC, Nath R, Derias N, Herbert A, Shepherd PS. Human papillomavirus type 16-specific T cell responses and their association with recurrence of cervical disease following treatment. *J Gen Virol* 2003;84:1063.
- [23] Stephens M, Donnelly P. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet* 2003;73:1162.
- [24] Garred P, Larsen F, Madsen HO, Koch C. Mannose-binding lectin deficiency—revisited. *Mol Immunol* 2003;40:73.
- [25] Bouwman LH, Roep BO, Roos A. Mannose-binding lectin: Clinical implications for infection, transplantation, and autoimmunity. *Hum Immunol* 2006;67:247.
- [26] Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet* 2000;67:444.

9.2. Artigo 02



HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil

M.F.P.T. Baldez da Silva¹, B.S. Chagas¹, V. Guimarães², L.M.C. Katz²,
P.M. Felix³, P.M. Miranda³, A.A. Lima⁴, L.C. Arraes⁵, D.B.G. Martins⁶,
J.L. Lima Filho⁶, R.C. Stocco³, S. Crovella^{6,7}, A.C. Freitas¹ and W. Beçak³

¹Departamento de Genética, Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

²Instituto Materno-Infantil Prof. Fernando Figueira, Recife, PE, Brasil

³Laboratório de Genética, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil

⁴Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil

⁵Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

⁶Laboratório de Imunopatologia Keizo Azami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

⁷Genetic Service IRCCS Burlo Garofolo and Department of Reproduction and Developmental Sciences, University of Trieste, Italy

Corresponding author: R.C. Stocco

E-mail: ritastocco@butantan.gov.br or ritastocco@yahoo.com

Genet. Mol. Res. 8 (4): 1437-1443 (2009)

Received August 25, 2009

Accepted September 30, 2009

Published December 1, 2009

ABSTRACT. Human papillomavirus (HPV) has been extensively studied concerning genomic structure, infection mechanisms, and diversity of types, as well as disease progression stages and development of vaccines. HPV type prevalence can differ in specific populations in different countries, according to ethnicity. This is the first report of an integrated project to evaluate the incidence of HPV types in different regions in Brazil in order to obtain data for vaccine development. Cervical samples were collected from women seen at a public hospital in Pernambuco, Northeast Brazil, for routine evaluation of genital alterations. Selection of the patients was random. There was a strong prevalence of HPV16 and a high incidence of HPV types 31 and 33. These

data foster the discussion about the need to evaluate viral prevalence in each geographic region in order to develop targeted vaccine programs.

Key words: Human papillomavirus; Cervical cancer; Genotyping; Prophylactic vaccines

INTRODUCTION

Human papillomavirus (HPV) has been the object of numerous investigations owing to its high mortality rates in females worldwide. The virus causes lesions in genital, upper respiratory, digestive tract, and skin tissues. If untreated, infection can develop into cancer and metastasis. More than 130 distinct HPV types have been described, and 18 are high risk due to association with genital cancer (Calleja-Macias et al., 2009).

The association between certain types of HPV and cervical cancer etiology is well established. HPV types may be classified as high, medium and low risk according to the lesion's severity (Stanley, 2001; Cubie, 2007). HPV types 6 and 11 are low risk since they only cause single or multiple genital warts. The most common high-risk HPVs are types 16, 18, 31, and 33 related to cervical, vulvar, vaginal, anal and penile cancer (zur Hausen, 2006).

HPV infections are related to the differentiation of the stratified epithelium (Pyeon et al., 2009). HPV enters the organism through local micro-lesions in basal epithelial cells and reaches the squamous cells through the virus cycle. Viral capsid disintegration occurs during the process coupled to the activation of early and late genes, and thus to the formation of virions in the apical epithelial layer (Wright et al., 2006; Szalmás and Kónya, 2009).

The viruses are mainly sexually transmitted, and certain factors, such as immunological suppression, oral contraceptives, smoking, multiple pregnancies, and vitamin deficiency, can increase chances of infection and act as cancer co-factors (Trottier and Franco, 2006; Wang et al., 2009; Al Daraji and Smith, 2009).

The development of vaccines requires better understanding of the HPV life cycle (Pyeon et al., 2009). Important studies on vaccines or virus-like particles (VLPs), produced by cloning capsid virus genes have been undertaken to increase the efficiency in HPV detection and treatment (Lowndes, 2006). VLPs are indistinguishable from native virions, preserve the conformational epitopes needed for developing neutralizing antibodies, and are able to trigger cell response (Wood et al., 2006; Hildesheim et al., 2006; Massad et al., 2009; Handisurya et al., 2009).

The quadrivalent vaccine with VLPs of L1 of types 6, 11, 16, and 18 and the bivalent vaccine with VLPs of L1 of HPV types 16 and 18 are the two commercial vaccines currently available on the market, and the costs are very high to make improvements in public health programs (zur Hausen, 2006).

HPV type 16 has been reported as the most prevalent in different Brazilian regions. The second more prevalent virus type discussed is type 18. HPV16 and HPV18 are included in two separate phylogenetic groups (Calleja-Macias et al., 2009). A previous study reported different HPV incidences in the different Brazilian regions: Lorenzato et al. (2000) discussed the major incidence of HPV31 and HPV33 in samples collected from women in Recife, Pernambuco. In this study, the aim was to determine the prevalence of high-risk HPV types in Recife, PE, Brazil. These results are highly relevant for public policies in HPV vaccination, which should take into account the virus types involved in the pathogenesis.

MATERIAL AND METHODS

Characteristics of the samples studied

Samples from females were provided by the Instituto Materno-Infantil Prof. Fernando Figueira (IMIP), from the metropolitan area of Recife, PE, Brazil, where they were selected at random. The significance of the study was explained to the patients, and written informed consent was obtained. The study was approved by the Ethics Committee of the IMIP. Cervical samples of 617 women were included in the study (median age 23 years, range = 18-35, inter-quartile range = 20-27). The patients were seen for routine evaluation due to abnormalities found in a Pap smear.

After scraping the endocervix area with a cytobrush, the samples were stored in 10 mM Tris-HCl and the DNA was extracted with the Genomic Prep Blood DNA isolation kit (GE Life Science), following the manufacturer protocol.

HPV analysis

HPV detection in the material collected was performed by polymerase chain reaction (PCR), using generic primers MY09/11, and the products were visualized by gel electrophoresis (Rambout et al., 2007). Previously, the DNA obtained from the collected samples was submitted to amplification of human β -globin sequence (primers PC04 and GH20) in order to verify the possibility of further PCR tests. Positive and negative controls were used in all procedures. The reaction mix was prepared with 5 μ L DNA, 1.6 μ M of each primer and 12.5 μ L MasterMix, in a total volume of 25 μ L. The amplification was carried out according to the following program: 94°C for 30 s, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min for 34 cycles, followed by 10 min up to the end at 72°C. Specific PCR primers for HPVs 16, 18, 31, and 33 were also used in PCR. The reaction mix was prepared in a total volume of 20 μ L containing 4 μ L DNA, 0.4 μ M of each specific primer and 10 μ L MasterMix. Amplification consisted of 35 cycles, with the following protocol: denaturation at 95°C for 30 s, primer annealing (temperatures varied according to primers) at 57°C (for HPVs 16 and 18) and 55°C (for HPVs 31 and 33) for 30 s, and primer extension at 72°C for 1 min, followed by final extension at 72°C for 10 min. The PCR products were visualized on a 2% agarose gel, with ethidium bromide under UV light.

Some patients were selected at random for conventional cytology screening to compare with HPV detection. The samples were collected and the swab material was smeared on glass slides using the cytobrush. The material was fixed in 95% ethanol and stained following the Papanicolaou method for analysis. The types of lesions were classified by cytological analysis based on the Bethesda classification of 2001.

RESULTS

PCR analysis for HPV detection was carried out with the DNA samples that were positive for the amplification of human β -globin primers (PC04 and GH20): 509 samples were qualitatively viable for analysis. The first analysis for HPV detection was performed using generic primers MY09 and MY11. A total of 288 (56.58%) samples were verified as showing HPV sequences. In the second procedure of amplification, the DNA of the samples shown to be positive for the presence of HPV sequences were submitted to amplification using specific primers to identify HPV16, HPV18, HPV31, and HPV33 types. With the use of the specific primers, it was

possible to identify a single HPV type in 213 samples: 168 were infected with HPV16 (78.87%), 6 with HPV18 (2.82%), 33 with HPV31 (15.49%), and 6 with HPV33 (2.82%) (Table 1).

Table 1. Detection of HPV sequences in group of patients selected at random: samples with only one virus type and samples showing simultaneous infections.

Viral type	Positive samples (%)	Samples showing simultaneous infection (%)	
HPV16	168 (78.67%)	HPV16/18	2 (2.67%)
HPV18	6 (2.82%)	HPV16/31	53 (70.67%)
HPV31	33 (15.49%)	HPV16/33	14 (18.66%)
HPV33	6 (2.82%)	HPV18/31	2 (2.67%)
		HPV16/18/31	1 (1.33%)
		HPV16/31/33	3 (4%)
Total	213 (100%)		75 (100%)

Considering the 288 samples in which it was possible to identify HPV sequences, 75 samples displaying more than one HPV type were detected: the results indicated that the association of types 16 and 31 was the most frequent (53, 70.67%), followed by 16/33 (14, 18.66%) (Table 1).

According to the selection of samples at random, 89 HPV-positive samples were chosen to evaluate the cytological data and the respective viral type. The data are summarized in Table 2A and B. It was observed that when women were infected with HPV16, they had a higher incidence of low-degree intraepithelial lesion (LSIL; 30.34%) compared to high-degree intraepithelial lesion (HSIL; 16.85%). When the second most common viral type (HPV31) was considered, the results were different: 5.62% of patients presented HSIL and 3.37% LSIL. Patients presenting HPV33 showed no detectable lesions. Yet, these values were higher compared to the group showing the fourth most common viral type, HPV18, which showed 1.12% incidence of LSIL and HSIL. In the cases of multiple infection, the results showed HSIL in women infected with HPV16/31 (5.62%) and 16/31/33 (2.25%). For HPV18/31 the patients showed only HSIL (1.12%).

Table 2. A, B. Viral type and cervical lesion found in 89 samples.

A. Cervical alterations		Number of samples (%)
LSIL		38 (42.70%)
HSIL		29 (32.58%)
Carcinoma		22 (24.72%)
Total		89 (100%)
B. Cervical alterations/viral type		Number of samples (%)
LSIL		
HPV16		27 (30.34%)
HPV18		1 (1.12%)
HPV31		3 (3.37%)
HPV16/18		1 (1.12%)
HPV16/31		2 (2.25%)
HPV16/33		3 (3.37%)
HPV18/31/33		1 (1.12%)
HSIL		
HPV16		15 (16.85%)
HPV18		1 (1.12%)
HPV31		5 (5.62%)
HPV16/31		5 (5.62%)
HPV18/31		1 (1.12%)
HPV16/31/33		2 (2.25%)
Carcinoma		
HPV16		15 (16.85%)
HPV31		2 (2.25%)
HPV16/31		2 (2.25%)
HPV16/33		3 (3.37%)
Total		89 (100%)

HSIL = high-degree intraepithelial lesion; LSIL = low-degree intraepithelial lesion.

In patients presenting carcinoma, 16.85% had HPV16, followed by HPV31 (2.25%). Analyzing the simultaneous infections, 2.25% of patients had HPV16/31 and 3.37% had HPV16/33.

DISCUSSION

Uterus cervical cancer is the second most common type of cancer in females worldwide: 493.000 new cases every year and 50% mortality rate (Parkin and Bray, 2006; Rama et al., 2008).

In South America, Brazil has the highest incidence of cancer of the cervix, accounting for 50% of the 49,025 cancer cases registered in 2000 (INCA, 2007). Based on current rates of cervical cancer and demographic changes, 18,680 new cases of cancer of the uterine cervix are expected in 2008, corresponding to an estimated risk of 19.2 per 100,000 women. In different regions of Brazil, the incidence of the disease is heterogeneous, being 24.4 per 100,000 women in the South, 22.2 in the North, 19.4 in the Central West, 17.8 in the Northeast and Southeast. In Pernambuco, the expectation is 22.7/100,000 new cases and in Recife 25.6/100,000 in 2008 (INCA, 2007).

Considering the association HPV-cervical cancer, type 16 is the most frequent worldwide, with the exception of Indonesia where type 18 is the most common (Silva et al., 2006). Although HPV type 16 is also the most frequent in Brazil, the second most important type differs according to the Brazilian region. HPV types 31 and 33 rank below HPV type 16 in the northeastern and central-western regions of Brazil, whereas HPV type 18 is the second most frequent cervical cancer in the northern, southeastern and southern regions of Brazil (Silva et al., 2006).

The results presented here obtained in samples selected at random suggest that in the population of Recife, Pernambuco, HPV type 31 (15.49%) could have higher incidence compared with HPV type 18 (2.82%), and HPV type 33 shows similar incidence (2.82%).

Although HPV DNA is genetically stable, it should be considered if HPV infections are independent or if the different virus types can compete for the same tissue target. Some studies have shown that pre-existing cervical-vaginal HPV infections increase the acquisition risk of other HPV genotypes in females and males leading to the concept that this virus type competition is improbable. On the other hand, available data show that HPV-mediated infections are independent from each other and fail to prove that genotype substitution is probable (Woodman et al., 2007).

The current study showed a high percentage of simultaneous infection, HPV16/31 (70.67%) and HPV16/33 (18.66%). Previous reports have shown that concomitant or sequential detection of more than one HPV type is common and more frequent than expected (Mendez et al., 2005). If different HPV types compete for the cervical epithelium, the need for a generic type vaccination may increase (Mendez et al., 2005; Silva et al., 2006; Woodman et al., 2007).

Therefore, considering the present preliminary results, for the Recife population, the bivalent or quadrivalent vaccine, which are not effective against types 31 and 33, can lead to serious consequences. With a significant rate of simultaneous infection, as HPV16/31 and HPV16/33, the studies mentioned above indicate that the vaccination program has to consider the characteristics of the population.

The present analysis showed that women infected with HPV type 16 had a high level of LSIL (30.34%), higher than HSIL (16.85%), but women infected with HPV type 31 showed a higher level of HSIL (5.62%) compared to LSIL (3.37%). These results showing a higher level of HSIL associated with HPV31 have to be discussed, considering regional differences and eventual interaction with different co-factors.

When we analyze the lesion HSIL and simultaneous infection, the results show that women infected with HPV16 in combination with HPV31 (5.62%) have a higher level of

this lesion, when compared to women infected with HPV18/31 (1.12%) and HPV18/31/33 (2.25%). These data demonstrate that when the most prevalent HPV16 is combined with the second most common type, HPV31, the rate of more severe lesions increases.

Studying the level of LSIL in HPV16/33, we found 3.37% when compared with HPV16/31 (2.25%), indicating that the association of the first most common HPV in the population, the viral type 16, and the third most common, HPV33, can also increase the level of alterations.

Some researchers observed that women in southern Italy that were infected with HPV16 had high-grade intraepithelial lesions, but when they were infected by types 31 or 33 the frequency of HSIL was lower (14.3%) than if they were infected by types 16 (42.8%). Curiously, HSIL were not observed with the virus type 18 (Yalti et al., 2005).

In regard to the data obtained in women presenting carcinoma, women infected with HPV16 (16.85%) had greater incidence of carcinoma, followed by HPV31 (2.25%). In simultaneous infection, HPV16/31, carcinoma was detected in 2.25% of the women and HPV16/33 in 3.37%. Women infected by virus types 31 and 33, combined or not with other types, presented more lesions of the type HSIL, as compared to virus type 18, and these results again have to be evaluated considering environmental aspects.

The greatest challenge in public vaccination is the distribution of less expensive vaccines covering the most different or polyvalent HPV types. High-risk HPV types 31 and 33, which show different regional incidences, should be included in the vaccines (Yalti et al., 2005).

HPV types with variegated oncogenic potentialities will continue to cause clinically significant cervical lesions. Although current prophylactic vaccines protect non-infected females against viruses with great oncogenic potential, those infected prior to vaccination or infected with other virus types will continue to need diagnosis and treatment for pre-neoplastic lesions.

Results from the current study and from non-conclusive data on the efficiency of bivalent and quadrivalent vaccine for types 31 and 33 suggest that the available vaccines cannot meet the requirements of different populations, such as that of Recife. Some studies mention vaccine protection for the above-mentioned types, but nothing can be claimed regarding their efficaciousness when it has been found that types 31 and 33 are as frequent as or even more frequent than the vaccine's virus types.

Identification of HPV types most commonly associated with cervical cancer in different Brazilian regions should be taken into consideration regarding prevention strategies: more effective and polyvalent vaccines should be developed and produced (Coimbra et al., 2007; Góes et al., 2008; Beçak et al., 2009; Ruiz et al., 2009).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to all professionals and students of Universidade Federal de Pernambuco who collaborated on this study and made all the data presented in this manuscript available. Carolina da Paz Sabino helped with editorial support. Instituto Materno-Infantil Prof. Fernando Figueira (IMIP) provided the samples of the patients and also clinical examinations. Research supported by MCT/CNPq, DECT/MS, Fundo Setorial de Biotecnologia (CT-Biotecnologia) and Saúde (CT-Saúde), FACEPE and FAPESP, in the form of fellowships (Project #554816/2006-7).

REFERENCES

Al-Daraji WI and Smith JH (2009). Infection and cervical neoplasia: facts and fiction. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2: 48-64.

Genetics and Molecular Research 8 (4): 1437-1443 (2009)

©FUNPEC-RP www.funpecrp.com.br

- Beçak W, Carvalho RF, Ruiz RM, Stocco RC, et al (2009). BPV-1 L1 expression in *E. coli*. Abstract Book of the 25th International Papillomavirus Conference Clinical and Educational Workshop, May 8-14, 2009, Malmö.
- Calleja-Macias IE, Villa LL, Prado JC, Kalantari M, et al. (2009). Worldwide genomic diversity of the high-risk human papillomavirus types 31, 35, 52 and 58, four close relatives of human papillomavirus type 16. *J. Virol.* 79: 13630-1340.
- Coimbra EC, Souza HM, Leitão MCG, Santos JF, et al. (2007). Virus-like particles as a vaccinal strategy against tumors induced by papillomavirus infection. *Commun. Curr. Res. Educ. Topics Trends Appl. Microbiol.* 2: 689-696.
- Cubie HA (2007). Papillomaviruses and Polyomaviruses. In: Medical Microbiology (Greenwood D, Slack R, Peutherer J and Barer M, eds.). 17th edn. Churchill Livingstone Elsevier, United Kingdom, 45: 446-456.
- Goês LGB, Freitas AC, Ferraz OP, Rieger TT, et al. (2008). Bovine papillomavirus type 4 L1 gene transfection in a *Drosophila* S2 cell expression system: absence of L1 protein expression. *Braz. J. Microbiol.* 39: 1-4.
- Handisurya A, Schellenbacher C and Kimbauer R (2009). Diseases caused by human papillomaviruses (HPV). *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 7: 453-466.
- Hildesheim A, Markowitz L, Avila MH and Franceschi S (2006). Chapter 27: Research needs following initial licensure of virus-like particle HPV vaccines. *Vaccine* 24 (Suppl 3): S3/227-S3/232.
- Instituto Nacional de Câncer (INCA) (2007). Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Ministério da Saúde, ISBN 978-7318-125-8, Rio de Janeiro. Available at [http://bvsip.ict.fiocruz.br/lilddi/docsonline/4/5/1454-estimativa_2008.pdf]. Accessed January 9, 2008.
- Lorenzato F, Ho L, Terry G, Singer A, et al. (2000). The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). *Int. J. Gynecol. Cancer* 10: 143-150.
- Lowndes CM (2006). Vaccines for cervical cancer. *Epidemiol. Infect.* 134: 1-12.
- Massad LS, Einstein M, Myers E, Wheeler CM, et al. (2009). The impact of human papillomavirus vaccination on cervical cancer prevention efforts. *Gynecol. Oncol.* 114: 360-364.
- Mendez F, Muñoz N, Posso H, Molano M, et al. (2005). Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types and possible implications for the prevention of cervical cancer by HPV vaccines. *J. Infect. Dis.* 192: 1158-1165.
- Parkin DM and Bray F (2006). Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 24 (Suppl 3): S3/11-S3/25.
- Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, et al. (2009). Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS. Pathol.* 5: e1000318.
- Rama C, Roteli-Martins C, Derchain S, Longatto-Filho A, et al. (2008). Previous screening for cervical cancer among women with cytological and histological abnormalities. [Rastreamento anterior para câncer de colo uterino em mulheres com alterações citológicas ou histológicas]. *Rev. Saúde Pública* 42: 411-419.
- Rambout L, Hopkins L, Hutton B and Fergusson D (2007). Prophylactic vaccination against human papillomavirus infection and disease in women: a systematic review of randomized controlled trials. *CMAJ* 177: 469-479.
- Ruiz RM, Sircili MP, Campo MS, Beçak W, et al. (2009). Avaliação imunológica preliminar da utilização da proteína recombinante L2 do papilomavírus bovino. Available at [<http://200.136.53.130:13580/cdrom/2009/sbm/cd/resumos/R2298-1.html>]. Accessed November 23, 2009.
- Silva AMTC, Amaral AMVT and Cruz AD (2006). HPV e Câncer: O papel do papiloma vírus humano na carcinogênese. *Biotechnol. Cienc. Desenvolv.* 29: 48-54.
- Stanley MA (2001). Human papillomavirus and cervical carcinogenesis. *Best Pract. Res. Biotechnol. Cienc. Desenvolv.* 29: 20-22.
- Szalmás A and Könyö J (2009). Epigenetic alterations in cervical carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 19: 144-152.
- Trottier H and Franco EL (2006). The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24 (Suppl 1): S1-S15.
- Wang SS, Zuna RE, Wentzensen N, Dunn ST, et al. (2009). Human papillomavirus cofactors by disease progression and human papillomavirus types in the study to understand cervical cancer early endpoints and determinants. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18: 113-120.
- Wood D, Shin JH, Duval B and Schmitt HJ (2006). Chapter 22: Assuring the quality, safety and efficacy of HPV vaccines: the scientific basis of regulatory expectations pre- and post-licensure. *Vaccine* 24 (Suppl 3): S3/187-S3/192.
- Woodman CBJ, Collins SI and Young LS (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat. Rev. Cancer* 7: 11-22.
- Wright TC, Bosch FX, Franco EL, Cuzick J, et al. (2006). Chapter 30: HPV vaccines and screening in the prevention of cervical cancer; conclusions from a 2006 workshop of international experts. *Vaccine* 24 (Suppl 3): S3/251-S3/261.
- Yalti S, Gurbuz B, Bilgic R, Cakar Y, et al. (2005). Evaluation of cytologic screening results of the cervix. *Int. J. Gynecol. Cancer* 15: 292-294.
- zur Hausen H (2006). Perspectives of contemporary papillomavirus research. *Vaccine* 24 (Suppl 3): S3/iii-S3/iv.

10. Memorial da aluna

Nome completo: Maria Fernanda Piffer Tomasi Baldez da Silva

Data de nascimento: 23/11/1981

e-mail: mfbaldez@hotmail.com

Curso de graduação: Ciências Biológicas - Bacharelado e Licenciatura

Colação de grau: 07/05/2004

Mestrado: Pós-graduação em Genética e Melhoramento

Área de concentração: Genética e Melhoramento

Colação de grau: 22/02/2006

Publicações científicas:

1. SILVA Maria Fernanda Piffer Tomasi Baldez, TOLEDO Fabiana, FERRARI Gisele Pezente, ROCHA Carmen Lucia de Melo Sartori Cardoso, VICENTINI Veronica Elisa Pimenta. Fresh water (well, rivers Sheet and Minas Gerais, close to the town of Ubiratã PR Brazil) and effects in the system of experimental animals. Acta Scientiarum, 25:101-105, 2004.
2. SILVA Maria Fernanda Piffer Tomasi Baldez, VICENTINI Veronica Elisa Pimenta. Polivitamin Accuvit: effect of its components. Arq. Apadec, 8(supl), maio de 2004 (CD room).
3. SILVA Maria Fernanda Piffer Tomasi Baldez, VICENTINI Veronica Elisa Pimenta. Vita Max phytotherapeutic vitamin complex, used in the fight against free radicals. Arq. Apadec, 8(supl), maio de 2004 (CD room).
4. SILVA Maria Fernanda Piffer Tomasi Baldez, LOPES Eraldo Ferreira, PAGLIARINI Maria Suely, SCAPIM Carlos Alberto. Effects of Endogamy on Microsporogenesis in Popcorn (*Zea mays* L.). Crop Breeding and Applied Biotechnology, 7: 321-326, 2007.
5. GUIMARÃES Vilma, GUIMARÃES Rafael, BRANDÃO Lucas, SILVA Maria Fernanda Piffer Tomasi Baldez, MILANESE Michele, SEGAT Ludovica, CASTELLETI Henrique, BRUNESKA Danielly, LIMA FILHO Jose Luiz, FREITAS Antonio Carlos, ARRAES Luis Cláudio, ROCHA Cintia, CROVELLA Sérgio. Association between functional *MBL2* gene polymorphisms and high risk HPV infection in Brazilian women. Human Immunology, 69, 273-278, 2008.

6. BALDEZ DA SILVA Maria Fernanda Piffer Tomasi., **CHAGAS** Bárbara Simas, **GUIMARÃES** Vilma, **KATZ** Letícia, **FÉLIX** PM, **MIRANDA** PM, **LIMA** AA, **ARRAES** Luiz Cláudio, **BRUNESKA** Daniella, **LIMA FILHO** José Luiz, **STOCCO** Rita Cássia, **CROVELLA** Sérgio, **FREITAS** Antonio Carlos, **BEÇAK** Willy. Evaluation of HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples collected from women randomly selected in Recife (Pernambuco, Brazil). Genetics and Molecular Research.