

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA
Dissertação de Mestrado**

**DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE MÚLTIPLOS TIPOS DO PAPILOMAVÍRUS
HUMANO (HPV) EM MULHERES HIV-POSITIVAS E HIV-NEGATIVAS EM
GOIÂNIA-GO**

MICHELLE CHRISTINE CARLOS RODRIGUES

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Vera Aparecida Saddi

GOIÂNIA – GO

2011

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA**

**DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE MÚLTIPLOS TIPOS DO PAPILOMAVÍRUS
HUMANO (HPV) EM MULHERES HIV-POSITIVAS E HIV-NEGATIVAS EM
GOIÂNIA-GO**

MICHELLE CHRISTINE CARLOS RODRIGUES

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Genética.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Vera Aparecida Saddi

GOIÂNIA – GO

2011

Ao meu Deus, que por meio de sua luz, guiou meus passos, e me permitiu chegar até aqui. À minha família, meu maior e verdadeiro amor. Aos meus avós, vovô Alencar e vovó Helena, agora ausentes, mas sempre em meu coração.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força, persistência e calma quando necessitei, sem Ele nada sou.

À Prof^a Dr^a Vera Saddi, minha orientadora, que me ensinou a caminhar no mundo da pesquisa, me dando conselhos, ensinamentos, e que agora, faz parte da minha história de vida. Nos caminhos que eu irei trilhar, com certeza, será uma das minhas referências, como pessoa e como pesquisadora. Meus grandes e sinceros agradecimentos!

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás pelos ensinamentos.

A todos os colegas do mestrado pela amizade, e incentivo sempre presentes.

Ao Renato pela atenção, e apoio durante toda a caminhada.

Ao colega Diego, obrigada pelas participações neste trabalho.

A Bhruna e Caio Bruno, pelo apoio, pela presença e amizade de vocês.

Ao Daniel, pelo compromisso e colaboração nos testes de hibridização, sua participação foi fundamental.

Aos colegas do Laboratório Santa Inês, Dr^a. Maria Helena, Dr. Elias, Joyce, Renata, Mayara, Suze, Andréia, e todo pessoal do Setor de triagem obrigada pela compreensão, amizade e apoio.

Aos colegas do Hospital Lúcio Rebelo, Dr^a. Cristhiane Kobal e Katiane.

Às minhas grandes amigas, Ana Cláudia, Ana Cristina, Renatinha, obrigada pela torcida.

Ao colega e futuro mestre Hidelberto Matos, pelas conversas, conselhos, e troca de experiências.

À acadêmica Linauri Carol, pela amizade e sua sede de estudar que muitas vezes me contagiou.

À D. Oscarina, pelas orações, e pelo apoio incondicional.

À D. Maria Amélia, pelas orações, pela torcida, e pela atenção!

A todos meus parentes, tia Betinha, tia Fátima, obrigada pelo apoio e pelas orações.

À minha querida prima Hellen Berta, obrigada pelo apoio, carinho e pelas brilhantes correções

Ao Salvador Gomes de Souza Júnior, meu amor, obrigada pelo companheirismo, incentivo, paciência e por sempre acreditar e torcer por mim.

Aos meus queridos avós, que estiveram presentes, na maior parte desse trabalho, mas que partiram. Obrigada pelo colo, pelo carinho, pelos elogios, pela atenção, pelo amor oferecido no olhar e nos gestos. A saudade é muito grande!

Às minhas irmãs Giselle e Helen Rose, obrigada por tudo. Por cuidarem de mim quando fraquejei, por lutaram comigo quando as forças pareciam poucas, e por sempre acreditarem em mim com a certeza que eu iria vencer essa caminhada! Amo vocês, minhas maninhas!

Aos meus pais, meus maiores amores! As palavras não são suficientes para expressar o amor e a gratidão que sufoca meu peito. Tudo que sou, tudo que tenho, são graças a vocês. Papai, obrigado por me impulsionar para frente, em meus estudos, e em minha vida profissional, me dando segurança, e sempre condições para lutar! Mamãe, minha confidente e meu esteio, obrigada pelo amor, pela luta e pela presença incondicional. Seu exemplo como pessoa e como cristã é muito precioso. Obrigada pelas orações, pela fé e pelo equilíbrio transferidos!

**A todos que participaram e colaboraram direta ou indiretamente para a
realização deste trabalho.**

RESUMO

Mulheres infectadas pelo HIV são mais susceptíveis à infecção por HPVs de alto risco oncogênico, que apresentam um potencial para a progressão para o câncer cervical. Conhecer a prevalência dos tipos específicos do papilomavirus humano nas mulheres HIV infectadas é necessário para planejar um rastreamento eficaz e estabelecer estratégias preventivas em tal população. Aqui, pudemos comparar a prevalência de infecções por múltiplos genótipos de HPV e de alterações citológicas em dois grupos de mulheres, HIV-positivas e HIV-negativas, da cidade de Goiânia-GO, Brasil. Esfregaços cervicais obtidos de 57 mulheres HIV-positivas e 57 mulheres HIV-negativas foram colhidos em meio conservante e enviadas para extração de DNA. A detecção de DNA e genotipagem do HPV foram realizadas usando o Kit *Linear Array HPV Genotyping Test*, de acordo com o manual fornecido pelo fabricante. Ambos os grupos foram semelhantes no que diz respeito à demografia, aos aspectos sociais e comportamentais. A detecção do DNA de HPV foi significativamente mais prevalente em mulheres HIV positivas, em comparação com as mulheres HIV-negativas (56,7% vs. 28,3%, $p = 0,003$). Coinfecção por vários genótipos de HPV também foi mais prevalente no grupo de HIV-positivas (88,2% vs. 58,8%, $p = 0,028$). O HPV16 foi o genótipo mais prevalente em ambos. Anormalidades citológicas foram observadas em 5,3% das mulheres HIV-negativas e 29,8% das mulheres HIV-positivas. A presença de HPV foi significativamente associada com anormalidades citológicas somente nas mulheres HIV-negativas. Nossos resultados demonstraram uma maior prevalência de infecção por HPV no grupo de mulheres HIV-positivas, com um elevado número de casos de infecção por vários genótipos. Enfatizamos aqui a necessidade de monitoramento frequente de mulheres infectadas pelo HIV, de modo a permitir o diagnóstico precoce e tratamento eficaz para neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) neste grupo de alto risco.

Palavras-chaves: [Papilomavírus Humano; Vírus da Imunodeficiência Humana; câncer cervical; múltiplos genótipos do HPV; hibridização]

ABSTRACT

HIV-infected women are more likely to be infected with high-risk HPV genotypes that have the potential for progressing to cervical cancer. To know the prevalence of type-specific human papillomavirus (HPV) infections in HIV-infected women is necessary in order to plan effective screening and preventive strategies in such population. Here, we compare the prevalence of infections with multiple HPV types and cytological abnormalities in two groups of women, HIV-positive and HIV-negative, in the city of Goiânia-GO, Brazil. Cervical smears obtained from 57 HIV-positive and 57 HIV-negative women were collected in a preservative medium and submitted to DNA extraction. HPV-DNA detection and genotyping were performed by using the *Linear Array HPV Genotyping Test* according to the manual provided by the manufacturer. Both groups were similar in regard to social aspects, demographics and behavioral characteristics. HPV DNA was significantly more prevalent in HIV-positive women, compared to HIV-negative women (56.7% vs. 28.3%, $p = 0.003$). Coinfections with HPV multiple genotypes was also more prevalent in the HIV-positive group (88.2% vs. 58.8%, $p = 0.028$). HPV16 was the most prevalent in both groups. Cytological abnormalities were observed in 5.3% of HIV-negative women and in 29.8% HIV-positive women. The presence of HPV was significantly associated with cytological abnormalities only in HIV-negative women. Our results demonstrated a greater prevalence of HPV infection in the HIV-positive group of women, with a greater prevalence of infection with multiple genotypes. We here emphasize the need of frequent monitoring of HIV-infected women, in order to allow early detection and efficient treatment for cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in this high-risk group.

Keywords: [Human Papillomavirus; Human Immunodeficiency Virus; cervical cancer; multiple HPV genotypes; hybridization]

LISTA DE FIGURAS

Figura – 1	Representação esquemática do genoma do Papilomavírus Humano	15
Figura – 2	Representação esquemática da árvore filogenética dos Papilomavírus Humanos	20
Figura – 3	Representação esquemática da progressão do câncer do colo do útero mediada pelo HPV	39
Figura – 4	Representação esquemática das principais etapas envolvidas na genotipagem do HPV através da hibridização reversa do produto de PCR baseada no sistema de <i>iniciadores</i> PGMY09/11 marcados com biotina	54
Figura – 5	Gráfico mostrando a prevalência dos resultados citológicos observados nas mulheres participantes do estudo	56
Figura – 6	Prevalência de anormalidades citológicas das amostras cervicais obtidas dos dois grupos de mulheres analisadas	59
Figura – 7	Gráfico mostrando a prevalência de infecção pelo HPV em mulheres HIV-negativas e HIV-positivas	60
Figura – 8	Gráfico mostrando a prevalência de infecção por HPV de alto risco e baixo risco oncogênico em mulheres HIV-negativas e HIV-positivas	63
Figura – 9	Distribuição dos genótipos detectados nas mulheres HIV-negativas e HIV-positivas	64

LISTA DE TABELAS

Tabela - 1	Funções das proteínas do HPV	16
Tabela - 2	Estudos sobre infecções por múltiplos tipos de HPV em mulheres HIV-positivas e HIV-negativas.	41
Tabela - 3	Análise univariada das características sócio-demográficas e comportamentais avaliadas para os dois grupos estudados	58
Tabela - 4	Análise univariada segundo as anormalidades citológicas dos grupos estudados	59
Tabela - 5	Análise descritiva das características das amostras cervicais em relação à presença de múltiplos genótipos de HPV	60
Tabela - 6	Distribuição dos genótipos de alto risco detectados nas mulheres HIV-positivas e HIV-negativas	61
Tabela - 7	Distribuição dos genótipos de baixo risco detectados nas mulheres HIV-positivas e HIV-negativas	62
Tabela - 8	Associação entre as anormalidades citológicas e a infecção por qualquer tipo de HPV e por tipos de alto risco oncogênico em mulheres HIV-positivas	65
Tabela - 9	Associação entre as anormalidades citológicas e a infecção por qualquer tipo de HPV e por tipos de alto risco oncogênico em mulheres HIV-negativas	65
Tabela - 10	Infecções pelo HPV conforme o número de genótipos detectados e o resultado citológico nos dois grupos avaliados	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AIDS** - Síndrome da imunodeficiência adquirida
- ASCUS** - Alterações em células escamosas de significado indeterminado
- CADA** - Centro de Apoio ao Doente com AIDS
- CP6108** - HPV 89
- DNA** - Ácido desoxirribonucléico
- dNTP** - Desoxi-nucleotídeos Trifosfato
- DST** - Doença sexualmente transmissível
- E**- Proteína Viral Precoce (*Early*)
- E2F**- Fatores de Transcrição
- E3**- Ubiquitina Ligase
- EGF**- Fator de crescimento epidérmico (*Epidermal Growth Factor*)
- E6-AP**- Proteína associada à E6 (*E6-Associated Protein*)
- FISH** - Hibridização in situ com fluorescência (*Fluorescent in situ hybridization*)
- HAART** - Terapia anti-retroviral altamente ativa (*Highly Active Anti-Retroviral Therapy*)
- HIV** - Vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus*)
- HSIL** - Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (*High Grade Squamous Intraepithelial Lesion*)
- HPV** - Papilomavírus humano
- HC2** - Captura Híbrida II (*Hybrid Capture II*)
- IARC**- Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer*)
- IC** - Intervalo de Confiança
- INCA** - Instituto Nacional de Câncer
- ISH** - Hibridização *in situ* (*In situ Hybridization*)
- IS39** - Subtipo do HPV 82
- Kb** – Quilobases (Kilobases)
- LAS**- Laboratório da Área da Saúde
- L** - Proteína Viral Tardia (*Late*)
- LA** - *Linear Array*
- LBA** - *Line Blot Assay*
- LCR** - Região Longa de Controle (*Long Control Region*)

LSIL - Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (*Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion*)

LTR – Região terminal longa (*Long Terminal Region*)

MS - Ministério da Saúde

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*)

Mg²⁺ - Íon Magnésio

NaOH - Hidróxido de Sódio

NIC - Neoplasia Intraepitelial Cervical

OR - *Odds Ratio*

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

NCR - Região não codificante (*Non-coding region*)

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCR - Reação em cadeia da polimerase

p53 - Proteína supressora de tumor de 53 Kilodaltons

pb - Pares de Bases

PGMY - Iniciadores de consenso para região L1

pPRb - Proteína do Retinoblastoma

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

RNA - Ácido ribonucléico

SNR - Região não codificadora

UCM - Meio Universal de Coleta (*Universal Collection Medium*)

URR - Região regulatória anterior (*Upstream Regulatory Region*)

VLP - Partícula semelhante ao vírus (*Virus like particles*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 BIOLOGIA DO HPV	15
1.2 CLASSIFICAÇÃO DOS GENÓTIPOS DE HPV	19
1.3 CICLO DE VIDA	22
1.4 MÉTODOS DE DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO HPV	24
1.4.1 Colpocitologia e Histologia	25
1.4.2 Testes moleculares	26
1.4.2.1 Hibridização <i>in situ</i>	27
1.4.2.2 Captura Híbrida II	28
1.4.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase	28
1.4.2.3.1 PCR tipo específica	29
1.4.2.3.2 PCR em tempo real	30
1.5 EPIDEMIOLOGIA: PREVALÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DE HPV	30
1.6 FATORES DE RISCO PARA DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER CERVICAL	32
1.6.1 Idade	33
1.6.2 Paridade	33
1.6.3 Uso de contraceptivos orais	33
1.6.4 Tabagismo	34
1.6.5 Imunossupressão ou presença do HIV	35
1.6.6 Presença de múltiplos genótipos virais	36
1.7 PERSISTÊNCIA VIRAL DA INFECÇÃO PELO HPV	36
1.8 EVOLUÇÃO DAS LESÕES PRÉ-NEOPLÁSTICAS	38
1.9 INFECÇÕES POR MÚLTIPLOS GENÓTIPOS DE HPV EM POPULAÇÕES HIV POSITIVAS E HIV-NEGATIVAS	40
1.10 DOENÇA CERVICAL UTERINA EM POPULAÇÕES HIV-POSITIVAS E HIV-NEGATIVAS	43
1.11 VACINAS	46
2 JUSTIFICATIVAS	48
3 OBJETIVOS	49
3.1 Objetivo geral	49

3.2 Objetivos específicos	49
4 METODOLOGIA	50
4.1 Desenho do estudo	50
4.2 Encaminhamento e aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa	50
4.3 Seleção das amostras	50
4.4 Coleta de espécimes cérvico-vaginais	51
4.5 Diagnósticos moleculares	51
4.6 Extração de DNA	51
4.7 Reação de PCR - Amplificação do DNA viral	52
4.8 Hibridização dos amplicons	53
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
6 RESULTADOS	56
6.1 Descrição dos dois grupos de mulheres: HIV-positivas e HIV-negativas	56
6.2 Prevalência de alterações citológicas cervicais	58
6.3 Prevalência de Infecção por HPV	59
6.4 Prevalência de infecções por múltiplos genótipos de HPV	60
6.5 Análise descritiva dos genótipos virais de acordo com o potencial oncogênico	61
6.6 Distribuição dos genótipos de HPV	63
6.7 Associações entre as anormalidades citológicas e infecção por qualquer genótipo de HPV e por genótipos de alto risco	64
6.8 Associações entre anormalidades citológicas e o número de genótipos de HPV	65
7 DISCUSSÃO	67
CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
Anexos	95

1 INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos e moleculares têm demonstrado que a infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) é o maior e o mais importante fator de risco para a neoplasia intraepitelial cervical e para o câncer cervical invasivo (BOSCH ET AL, 1995; VILLA, 1997; BOSCH ET AL, 2002).

A relação entre o câncer cervical e o HPV de tipo oncogênico já está bem estabelecida (OLIVEIRA-SILVA ET AL, 2008). Em um estudo mundial, o genoma do HPV foi detectado em 93% de 1.000 amostras histológicas de câncer cervical, coletadas em 22 países. O HPV 16 foi encontrado em 50% das amostras, seguido do HPV 18, 45 e 31. As amostras negativas deste estudo foram reavaliadas, o que permitiu a detecção do DNA viral em 99,7% das amostras analisadas (BOSCH ET AL, 1995; WALBOOMERS ET AL, 1999).

O papilomavírus humano é o vírus sexualmente transmissível mais comum em pessoas jovens e sexualmente ativas de ambos os sexos (CARVALHO ET AL, 2010).

Geralmente, a infecção viral é assintomática, porém, quando é sintomática, o HPV causa desordens proliferativas benignas e malignas no epitélio, incluindo as verrugas genitais e o câncer cervical (HO, 2010; LETO ET AL, 2011).

Atualmente, a infecção induzida pelo papilomavírus humano na região anogenital adquiriu o caráter de uma verdadeira epidemia (FILHO ET AL, 2003). A infecção pelo HPV causa anualmente cerca de 466.000 novos casos de câncer cervical, sendo esta uma importante causa de morbidade e mortalidade nos Estados Unidos e em todo mundo (AULT, 2006; SEHGAL & SINGH, 2009). Um estudo conduzido em mulheres com câncer cervical estimou que elas morrem aproximadamente 18 anos mais precocemente do que aquelas que nunca tiveram câncer (SEHGAL & SINGH, 2009).

O câncer cervical é o segundo câncer mais prevalente em todo mundo (DEHN ET AL, 2007; BEGLIN ET AL, 2009). A Organização Mundial de Saúde (OMS) aponta o câncer cervical como a segunda neoplasia maligna mais prevalente em mulheres (BASEMAN & KOUSTLY, 2005; SILVA ET AL, 2009).

Estudos mundiais mostram que a prevalência da infecção pelo HPV em mulheres tende a variar entre 2% a 44% (BOSCH & SANJOSÉ, 2003; CUSHIREI ET AL, 2004; CLIFFORD ET AL, 2005; BASEMAN & KOUSTLY, 2005). Essa variação é decorrente de vários aspectos como: diferenças na amostra analisada, emprego de diferentes métodos diagnósticos e diferentes regiões geográficas onde os estudos são realizados (HIPPELAINEN ET AL, 1993; DERCHAIN ET AL, 1995; FRANCO 1995; HO ET AL, 1995; BURK ET AL, 1996; CASTELLSAGUE ET AL, 1997; BOSCH ET AL, 2003, BASEMAN & KOUSTLY, 2005).

Estudos epidemiológicos sugerem que 75% das mulheres sexualmente ativas serão infectadas pelo HPV em algum momento de suas vidas (MOSCICKI, 2005), sendo que a metade dos novos casos ocorrerá nos primeiros anos de atividade sexual (NADAL & MANZIONE, 2006).

Estudos baseados na pesquisa do DNA do HPV combinados com a quantificação de anticorpos tipo-específicos contra o capsídeo viral têm demonstrado que mais de 50% das mulheres sexualmente ativas são infectadas por um ou mais tipos de HPV (BASEMAN & KOUSTLY, 2005).

Segundo projeções do Instituto Nacional do Câncer (INCA), em 2010, surgiram 18.430 novos casos de câncer cervical, com um risco estimado de 18,47 a cada 100 mil mulheres, dados superados apenas pelo câncer de mama. Na região central do Brasil, o câncer cervical é o segundo câncer mais comum na população feminina. No ano de 2010, estimou-se 540 casos novos de câncer de colo uterino, com uma taxa bruta de incidência de 17,68 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2010).

Um estudo longitudinal realizado pelo o Instituto Ludwig e pela Universidade McGill, do Canadá, em São Paulo, no período de 1993 e 1997, investigou 2.538 mulheres com idade média de 32 anos, a fim de traçar um perfil das infecções genitais na população e identificar as infecções de caráter persistente. O estudo encontrou uma prevalência de infecção pelo HPV em 13,8% dos casos, sendo que o HPV 16 foi o genótipo mais prevalente, seguido pelo HPVs 53, 58, 6, 11, 31 e 18 (FRANCO ET AL, 1999).

Estudos epidemiológicos e moleculares têm elucidado que a infecção persistente com alta carga viral, por tipos oncogênicos do papilomavírus desempenha um papel preponderante no desenvolvimento do câncer do colo uterino

sendo esse vírus detectado em quase todas as lesões pré-neoplásicas e neoplásicas (QUEIROZ, 2007).

Estudos de coorte indicam que o risco para a neoplasia cervical é maior entre mulheres que desenvolvem infecção persistente pelo HPV de alto risco oncogênico. Por outro lado, o papel das coinfeções por múltiplos genótipos virais na neoplasia cervical continua indeterminado (TROTIER, 2006).

Assim, estudos epidemiológicos e moleculares demonstram, de forma conclusiva, que o HPV é o fator necessário para o desenvolvimento do câncer cervical e de suas lesões precursoras (BOSCH ET AL, 1995; KOUTSKY, 1997; WALBOOMERS ET AL, 1999; MUÑOZ, 2000; BOSCH ET AL, 2002; MUÑOZ ET AL, 2003; BASEMAN & KOUSTLY, 2005).

1.1 BIOLOGIA DO HPV

O HPV é um vírus pequeno, não-envelopado, medindo de 45 a 55 nm de diâmetro e com genoma de aproximadamente 7.200 a 8.000 pares de bases. O DNA genômico circular de fita dupla está envolto por um capsídeo com simetria icosaédrica, composto de 72 capsômeros formados por duas proteínas estruturais, denominadas L1 e L2 - Figura 1 (RICHART ET AL, 1998; MUNGER ET AL, 2004; SZOSTEK ET AL, 2006; GNANAMONY ET AL, 2007; GALANI & CHRISTODOULOU, 2009; LETO ET AL, 2011).

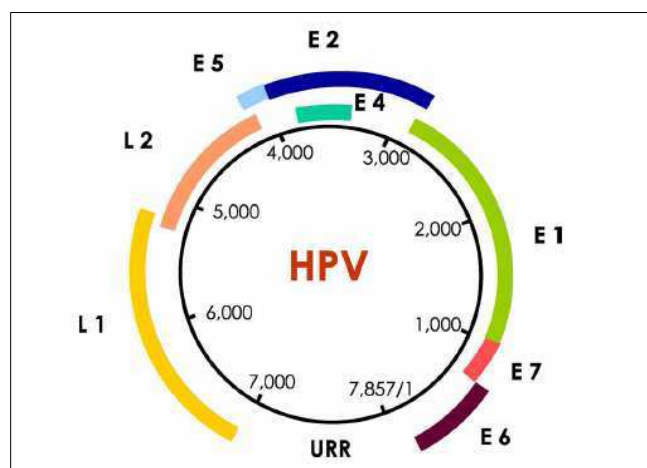


FIGURA 1: Representação esquemática do genoma do papilomavirus humano. Fonte: MUNOZ ET AL, 2006.

Os genes virais se classificam em precoces (*early*, E) e tardios (*late*, L), dependendo de quando são expressos e são enumerados conforme seu tamanho (MÜNGER ET AL, 2004; DEHN ET AL, 2007; LETO ET AL, 2011) (Tabela 1). A região E codifica 7 ou 8 proteínas, que estão associadas à replicação do DNA viral, transcrição e transformação celular, executando as funções regulatórias vitais para a produção da progênie viral. A região L codifica duas proteínas do capsídeo responsáveis pela produção viral e empacotamento do DNA (SANCLEMENTE & GILL, 2002). As funções dessas proteínas estão resumidas na Tabela 1.

TABELA 1: Funções das proteínas do HPV. Fonte: modificado de SANCLEMENTE & GILL, 2002

GENE	FUNÇÃO
E1	Atividade de DNA helicase; ligação de ATP-DNA-dependente, atividade de ATPase.
E2	Replicação viral e repressão da replicação celular; regulador da transcrição; controle da região de expressão precoce (<i>Early</i>).
E3	Sem função reconhecida; encontrada na minoria dos vírus.
E4	Expresso primeiramente em epitélios em diferenciação, associado ao citoesqueleto de ceratina de células epiteliais em cultura; papel na liberação de vírus.
E5	Atividade de transformação do HPV 16 <i>in vitro</i> ; possivelmente estimula o início da proliferação <i>in vivo</i> ; pode desempenhar papel na iniciação da carcinogênese.
E6	Papel no processo de transformação junto com E7; propriedades de ativação transcricional; inativa p53 pela rápida degradação pela via proteossômica; junto com E7 propicia um ambiente celular para a replicação viral.
E7	Induz a síntese de DNA em células de repouso; liga-se a forma hipofosforilada da proteína do retinoblastoma (pPRb) inativando-a e permitindo a progressão para a fase S do ciclo celular.
E8	Sem função reconhecida; encontrada na minoria dos vírus.
L1	Proteína principal do capsídeo viral.
L2	Proteína secundária do capsídeo viral.

O genoma viral com potencial de codificar proteínas é dividido em regiões denominadas ORFs (*Open Reading Frames* ou unidades de tradução ou ainda fases abertas de leitura). As ORFs incluem: a região precoce, de aproximadamente 4 kb, a região tardia, com 3 kb, e a região denominada LCR (*Long Control Region*) com 1 kb, sendo cada uma diferenciada conforme a função que exercem (MACIAG & VILLA, 1999; MÜNGER ET AL, 2004; LETO ET AL, 2011).

A região precoce, constituída pelas ORFs E1, E2, E4, E5, E6 e E7 apresenta genes que codificam proteínas envolvidas na regulação da replicação do DNA viral, na proliferação celular e na interação com o genoma do hospedeiro, programando a célula hospedeira a produzir novo DNA viral. Esta região tem sido extensivamente estudada, pois as proteínas codificadas pelos genes contidos nessa região estão associadas com o desenvolvimento de neoplasias (RICHART ET AL, 1998; STEBEN & DUARTE FRANCO, 2007).

A região tardia constituída pelas ORFs L1 e L2, onde estão localizados os genes *L1* e *L2*, responsáveis pela codificação de proteínas virais do capsídeo, sendo sua expressão restrita à parte diferenciada do epitélio (FARIDI, 2011).

A proteína L1 é a mais abundante do capsídeo viral e constitui cerca de 80% de todas as proteínas virais. Em sua extremidade, existem epítomos tipo-específicos que lhe conferem a característica de ser altamente imunogênica. A proteína L2, associada à L1, participa da incorporação do DNA viral (HOORY ET AL, 2008). A sequência L1 é altamente conservada e similar a todos os tipos de HPV e a sequência L2, ao contrário, é altamente variável e determinante da antigenicidade do HPV (RICHART ET AL, 1998; LETO ET AL, 2011).

A região longa de controle, situada entre os genes *L1* e *E6*, não é codificante, é pouco conservada e apresenta de 400 a 1000 pares de bases. Sua função é essencial na regulação da replicação viral e da transcrição de sequências contidas na região precoce (RIVOIRE ET AL, 2006; CAVALCANTI & CARESTIATO 2006; QUEIROZ, 2007). Nesta região, foram identificados vários sítios para ligação de elementos regulatórios virais (proteína E2) ou celulares (fatores de transcrição), elementos responsivos aos hormônios glicocorticóides e progesterona, ambos determinantes na modulação positiva ou negativa da transcrição do genoma viral (HOORY ET AL, 2008).

Existe ainda uma região curta não-codificadora (SNR), entre as sequências E5 e L2, cuja função biológica não está bem estabelecida (QUEIROZ, 2007).

As regiões E1 e E2 são particularmente importantes pela codificação de proteínas que regulam a transcrição e a replicação viral (RICHART ET AL, 1998; GNANAMONY ET AL, 2007). A proteína E2 exerce um importante papel como repressora da expressão dos genes *E6* e *E7* (GNANAMONY ET AL, 2007) e também possui uma atividade estimuladora da função da proteína supressora tumoral p53. Estudos moleculares indicam que a expressão de *E2* pode resultar em apoptose (VILLA, 2003; SCHIFFMAN & CASTLE, 2003).

Quando ocorre a integração viral, a região dos genes *E1* e *E2* sofrem uma interrupção do controle transcricional, fazendo com que haja perda da função controladora de E2, resultando em descontrole na expressão da região precoce do genoma viral, e conseqüentemente, na síntese contínua das proteínas E6 e E7 (VILLA, 1998).

O gene *E4* codifica a proteína E4 que interrompe a rede citoplasmática de queratina, afetando a estabilidade mecânica do citoesqueleto celular, o que sugere sua participação na liberação das partículas virais (DOOBAR, 2005). Essa proteína também contribui na regulação do controle do ciclo celular da célula hospedeira, na maturação viral e na alteração da matriz intracelular (BURD, 2003; GNANAMONY ET AL, 2007).

A proteína E5 é expressa nos estágios iniciais da infecção viral, modificando a transdução de sinais gerados pelo receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF) e bloqueando a expressão de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe I na membrana plasmática. Tal proteína participa na transformação celular e exerce um importante papel na replicação viral (BURD, 2003; GNANAMONY ET AL, 2007).

As proteínas E6 e E7 exercem um importante papel na replicação viral, induzindo a proliferação e a eventual imortalização e transformação maligna celular (THOMAS ET AL, 1999; SILVA ET AL, 2003). Várias funções têm sido descritas para as proteínas E6 e E7. Observações iniciais revelaram que E6 interage com a proteína p53 e E7 interage com a proteína do retinoblastoma (pPRb) para bloquear a atividade destas proteínas supressoras de tumor (ZUR HAUNSEN, 2002).

Normalmente, quando ocorrem erros na molécula de DNA, a proteína p53 exerce seu papel, a fim de que o DNA seja reparado. Caso isso não ocorra, a proteína é capaz de reprimir o crescimento celular e sinalizar para outras proteínas reguladoras induzirem a apoptose celular. Quando ocorre a inativação da proteína p53 há uma perda do controle do ciclo celular, levando à repressão da ciclina B, proteína que forma um complexo com a CDK1 e apresenta um papel de promotor de mitose, regulando a transição de G2 para a fase M no ciclo celular normal (FERMANN & LAIMINS, 2003).

A proteína nuclear E6 possui aproximadamente 150 aminoácidos e apresenta uma massa molecular de aproximadamente 18 kDa (THOMAS ET AL, 1999). Essa proteína recruta a proteína celular E6AP, que funciona como uma ubiquitina-ligase levando à degradação da p53 pela via de proteólise dependente de ubiquitina. A degradação de p53, promovida pela proteína E6 do HPV, resulta na perda do controle do ciclo celular, na resistência para apoptose e num aumento da instabilidade cromossomal (ZUR HAUNSEN, 2002; SILVA ET AL, 2003).

A princípio, acreditava-se que apenas as proteínas E6 do HPV de alto risco oncogênico eram capazes de se ligar a p53. No entanto, no estudo desenvolvido por STOREY ET AL (1998), observou-se que a proteína do HPV 11, genótipo viral de baixo risco oncogênico, também é capaz de degradar p53, porém, com menor intensidade comparada à proteína do HPV 16.

A proteína E7 é uma fosfoproteína, com aproximadamente 100 aminoácidos, que se liga à forma hipofosforilada da proteína celular pRb, uma proteína supressora de tumor (ZUR HAUSEN, 2000).

1.2 CLASSIFICAÇÃO DOS GENÓTIPOS DE HPV

O HPV faz parte da família *Papillomaviridae*, gêneros papiloma Alfa, Beta, Gama, Delta, Kappa, entre outros (DE VILLERS, 2004; LETO ET AL, 2011).

Trata-se de um vírus ubíquos, detectados em uma grande variedade de animais (BURD, 2003; STEBEN & DUARTE-FRANCO, 2007; GHITTONI, 2010). São vírus mucoepiteliotrópicos que afetam predominantemente pele e mucosas,

produzindo proliferações epiteliais características no sítio de infecção (MACIAG & VILLA, 1999; SZOSTEK ET AL, 2006; BEGLIN, 2009).

Após o advento das técnicas moleculares, a taxonomia desse vírus passou a ser feita com base na completa identificação da sequência de nucleotídeos da região L1 do genoma viral – Figura 2 (CAVALCANTI & CARESTIATO, 2006; DENH ET AL, 2007; HOORY ET AL, 2008). Atualmente, considera-se um novo tipo de HPV quando a sequência de nucleotídeos dos genes *L1*, *E6* e *E7* apresentam diferenças em mais de 10% dos tipos virais já conhecidos. Caso essas diferenças sejam menores que 2%, o novo tipo isolado é caracterizado como uma variante do mesmo tipo. Já os subtipos virais, apresentam em seu genoma diferenças nas sequências nucleotídicas entre 2% e 10% dos tipos descritos (BURD, 2003).

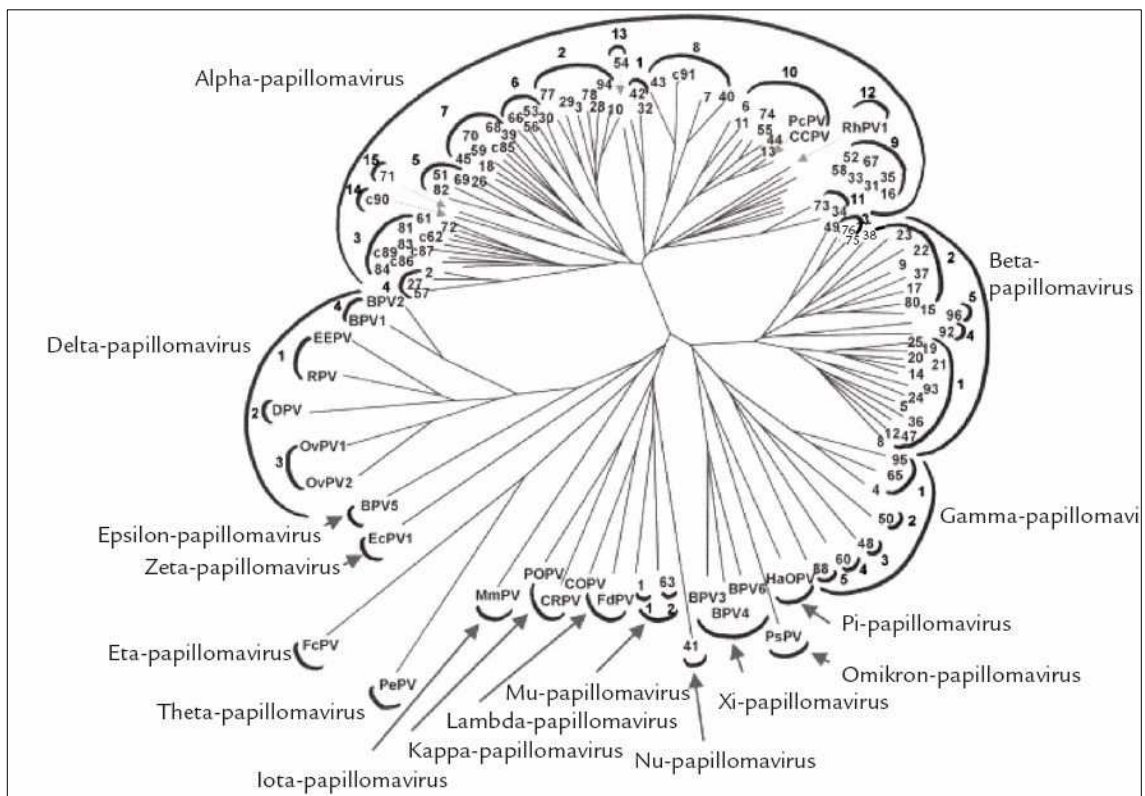


Figura 2 – Representação esquemática da árvore filogenética do Papilomavírus humano (Modificado de HOORY ET AL, 2008).

Com relação à variação da sequência genômica, cerca de 200 tipos de HPV já foram identificados em seres humanos (LIZANO ET AL, 2009; BERNARD ET AL, 2010). A princípio, a classificação dos tipos de HPV primeiramente era feita por meio

da técnica de hibridização, sendo que a cada novo tipo de papillomavírus identificado era atribuída uma denominação numérica conforme a ordem de identificação (CAVALCANTI, 2006; SZOSTEK, 2006).

Os HPVs responsáveis por infecções em mucosas, incluindo a região anogenital e a cavidade oral, pertencem ao gênero *Alphapapillomavirus*. A classificação proposta atualmente, classifica o gênero *Alphapapillomavirus* em 189 tipos diferentes de papilomavírus classificados em 14 espécies (DE VILLIERS ET AL, 2004).

De todos os tipos descritos, aproximadamente 40 tipos de HPV são capazes de infectar o trato anogenital, dos quais 15 tipos apresentam alto potencial oncogênico para o epitélio da cérvix uterina (BOSH ET AL, 1995; MUÑOZ ET AL, 2003; BASEMAN & KOUSTLY, 2005; STEBEN & DUARTE-FRANCO, 2007). Conforme sua associação com o câncer cervical e lesões precursoras, os HPVs que infectam o trato anogenital são classificados em baixo risco e alto risco oncogênico (BURD, 2003; GNANAMONY ET AL, 2007; GALANI & CHRISTODOULOU, 2009).

O HPV 6, 11, 26, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e *cond* HPV 89/Cp6108 na maioria dos casos estão associados com lesões benignas que afetam a área anogenital, como as verrugas genitais, lesão intraepitelial escamosa de baixo grau da cérvix e da vulva, sendo então considerados de baixo risco oncogênico (STEBEN & DUARTE-FRANCO, 2007; CARVALHO ET AL, 2010). Os HPVs de alto risco estão ainda associados com a maioria dos casos de cânceres anal, peniano, vaginal, vulvar, orofaríngeo, incluindo os genótipos HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 e 82 (COX, 2006; CARVALHO ET AL, 2010).

MUNOZ ET AL (2003), em uma análise agrupada de todos os tipos de câncer associados ao HPV, encontrou os genótipos 16, 18, 45 e 31 como os mais importantes tipos oncogênicos.

Os genótipos HPV 16 e 18, na maioria dos estudos epidemiológicos, são mais presentes em lesões intraepiteliais de alto grau e no carcinoma invasivo (CARVALHO ET AL, 2005; OLIVEIRA-SILVA ET AL, 2011). O HPV 16 é o genótipo mais prevalente, sendo identificado em quase 50% das mulheres com neoplasia intraepitelial grau 3 (NIC III) e câncer cervical invasivo, sendo também detectado em 21% das mulheres com lesão escamosa de baixo grau (LSIL) (GNANAMONY ET AL,

2007; HO, 2009). O HPV 18 causa de 10 a 15% de NIC III e câncer cervical e é encontrado em mais de 35% dos adenocarcinomas cervicais (HO, 2010).

Conforme sua especificidade epitelial, o HPV pode ser classificado como cutâneotrópico ou mucoso-genitotrópico. Os cutâneotrópicos incluem os genótipos que afetam as regiões não genitais, sendo geralmente associados a lesões verrucosas benignas da face, mãos e pés, enquanto que os mucoso-genitotrópicos infectam especialmente a mucosa genital, podendo ainda infectar outras mucosas do organismo humano (TOLEDO, 2005).

1.3 CICLO DE VIDA

O HPV é transmitido de um indivíduo para outro por contato direto, sendo a via sexual o modo de transmissão mais importante (QUEIROZ, 2007).

O ciclo de replicação viral é a chave para entender a patogênese e a imunobiologia desse vírus. O conhecimento do ciclo de vida do vírus ainda é limitado em alguns pontos, devido principalmente à inabilidade de se cultivar células infectadas, por longo período de tempo, dificultando a análise do ciclo completo da infecção *in vitro* (STANLEY, 2001).

O ciclo de vida do HPV é diretamente dependente da diferenciação das células do hospedeiro (LETO ET AL, 2011). A infecção inicial por HPV ocorre em células epiteliais basais ou em células que estão transitoriamente se dividindo, localizadas nas camadas mais profundas do epitélio estratificado. O vírus pode infectar células da camada basal tanto dos epitélios de mucosas que recobrem a boca, garganta, trato respiratório e trato anogenital (STUBENRAUCH & LAIMINS, 1999, SOUTO ET AL, 2005; CAVALCANTI & CARESTIATO, 2006; BEGLIN, 2009; LIZANO ET AL, 2009).

Os mecanismos de infecção dos papilomavírus, desde sua adesão à superfície celular, transporte ao núcleo e perda do capsídeo, ainda não estão completamente elucidados. Sabe-se que em decorrência de microabrasões ou microlesões da pele e mucosas, o vírus entra na célula hospedeira por meio da ligação do HPV a um receptor protéico específico na membrana celular (VILLA, 1995; GNANAMONY ET AL, 2007). O receptor que liga-se a partícula viral ainda

permanece desconhecido, contudo estudos sugerem que o sulfato de heparina seja o elemento responsável para a conexão inicial de virions às células (B EGLIN, 2009).

Após sua entrada nos queratinócitos da camada basal, os genomas do HPV são estabilizados na forma de elementos extracromossômicos nos núcleos em um número de aproximadamente 20 a 50 cópias, ocorrendo nesse período um baixo nível de expressão do HPV. Nas células basais, a partícula viral pode permanecer na forma latente ou se replicar (LIZANO ET AL, 2009).

Em um segundo momento, ocorre um maior nível de expressão das proteínas e a montagem dos vírus, quando parte da progênie viral migra para as células mais diferenciadas das camadas superficiais do epitélio, que são destinadas a apoptose e à descamação (DOOPRBAR & STERLING, 2001; ZUR HAUSEN, 2002; SOUTO, 2005; FRAZER ET AL, 2006; MUNOZ, 2006; B EGLIN, 2009).

Após a penetração viral, primeiramente ocorre perda parcial ou total do capsídeo e exposição do genoma. Ao chegar ao núcleo das células epiteliais basais e parabasais, o HPV está pronto para continuar seu ciclo de replicação, executando a transcrição do DNA em RNA mensageiro (RNAm) (ZUR HAUSEN, 2000; GIARRÉ ET AL, 2001; HILDESHEIM & WANG, 2002; ZUR HAUSEN, 2008; LIZANO ET AL, 2009).

Em seguida, pela interação de fatores celulares com a LCR, inicia a transcrição de *E6* e *E7*. Os oncogenes virais atrasam o processo de diferenciação celular e estimulam a proliferação celular, geralmente aumentando a espessura das camadas supra-basais. As proteínas *E1* e *E2* são as próximas a serem sintetizadas. A proteína *E2* bloqueia a transcrição precoce de *E6* e *E7*, liberando a ação das proteínas *p53* e *p107*, *pPRb*, e o processo de diferenciação epitelial continua (ZUR HAUSEN, 2000; GIARRÉ ET AL, 2001; HILDESHEIM & WANG, 2002; ZUR HAUSEN, 2008; LIZANO ET AL, 2009).

As proteínas *L1* e *L2* do capsídeo viral são sintetizadas e juntamente com o genoma, formam partículas virais em células bem diferenciadas da camada superficial do epitélio cervical. Os genomas virais permanecem no núcleo das células basais infectadas e são distribuídos para as células-filhas durante a mitose (ZUR HAUSEN, 2000; GIARRÉ ET AL, 2001; HILDESHEIM & WANG, 2002; ZUR HAUSEN, 2008, LIZANO ET AL, 2009).

O HPV pode estar na célula hospedeira sob três formas: na forma epissomal, na forma integrada e nas duas formas simultaneamente, epissomal e integrada. Em seu estado epissomal, a expressão gênica do vírus é regulada por E2, embora haja uma expressão limitada de genes especificamente precoces (*E5*, *E6* e *E7*) resultando um aumento da proliferação das células infectadas. Quando a integração viral ocorre no genoma da célula hospedeira, há uma perda do controle da expressão dos oncogenes. A integração do DNA viral correlaciona-se com aumento da expressão gênica, aumento celular e com a progressão de lesões de baixo grau em lesões de alto grau (JAYSHREE ET AL, 2009).

A expressão contínua dos oncogenes *E6* e *E7* é necessária na indução e manutenção do fenótipo neoplásico das células cervicais. Entretanto, está bem estabelecido que os oncogenes virais são necessários, porém não são suficientes para a imortalização celular e malignização do fenótipo (HO, 2010; JAYSHREE ET AL, 2009).

Ao se dividirem, as células infectadas distribuem equitativamente o DNA viral entre as células filhas. Uma das células filhas migra ao longo da camada basal iniciando o programa de diferenciação. A outra célula filha continua indiferenciada na camada basal sofrendo divisões para oferecer células para diferenciação e células para manutenção da camada basal. A célula então corresponde a um reservatório de DNA viral (DOOPRBAR & STERLING, 2001; ZUR HAUSEN, 2002; SOUTO ET AL, 2005; FRAZER ET AL, 2006).

Apesar da infecção do HPV acontecer nas camadas basais, a produção do vírus é restrita às células das camadas suprabasais, pois as células da camada basal não são lisadas pela produção dos vírions, permitindo sua proliferação. Essa diferenciação promove a infecção e manutenção persistente do HPV nas camadas basais por muito tempo chegando até vários anos (STUBENRAUCH & LAIMINS, 1999).

1.4 MÉTODOS DE DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO HPV

A alta incidência de câncer cervical aponta para a necessidade de diagnosticar lesões causadas pelo o HPV precocemente. A detecção precoce de

lesões pré-malignas pode prevenir a progressão ao câncer e diminuir a sua alta incidência na população. A forte associação entre o HPV e o câncer cervical estimula o desenvolvimento de vários testes diagnósticos, principalmente os baseados em biologia molecular (CARVALHO ET AL, 2010).

A infecção pelo HPV pode evidenciar-se indiretamente pelo exame citológico e histopatológico, ou diretamente pelos métodos moleculares, que ao contrário dos anteriores, permitem detectar o genoma viral e o tipo viral envolvido (GUGLIELMO, 2010). Neste contexto, os testes moleculares passaram a ser uma ferramenta para confirmação da infecção pelo HPV.

1.4.1 Colpocitologia e Histologia

Essa metodologia detecta as alterações compatíveis com a infecção pelo HPV, a partir de graus morfológicos que sugerem a existência da infecção (CAVALVANTI & CARESTIATO, 2006; GNANAMONY ET AL, 2007).

A colpocitologia tem sido a metodologia mais utilizada para se detectar as lesões pré-cancerosas do colo uterino. Após ter sido usada pela primeira vez em 1943, por Papanicolaou e Traut, passou a ser então uma grande ferramenta nos programas de rastreamento, contribuindo para a detecção precoce do câncer cervical (LEE, 2005; GNANAMONY ET AL, 2007).

O exame de Papanicolaou consiste no estudo das células descamadas esfoliadas da ectocérvice e endocérvice do colo uterino (BEZERRA ET AL, 2005). Este exame é o método de escolha desde a década de 1950, o que tem sido muito valioso para triagem em massa, por ser capaz de detectar lesões e orientar o tratamento adequado. Contudo, o teste tem sensibilidade limitada, sendo relatada uma taxa geral de resultado falso-negativo de 20% a 30% (CARESTIATO ET AL, 2006) e, em lesões pré-malignas e malignas, de 15% a 50%. O exame fornece resultado falso-positivo em cerca de 30% dos casos (JACOBS ET AL, 1999). A desvantagem da técnica, além dos resultados falsos-positivos, é que muitas vezes leva a diagnósticos equivocados que não podem ser confirmados, tratamentos excessivos e tratamentos inadequados (GUGLIELMO, 2010).

Contudo, esta técnica é a única que tem auxiliado na redução da incidência do câncer cervical e das taxas de mortalidade, numa proporção de cerca da metade para dois terços (BURD, 2003).

O diagnóstico histopatológico da infecção pelo HPV é de suma importância, pois nele se baseia a maioria das decisões terapêuticas até o momento. Além de auxiliar no diagnóstico da infecção pelo HPV, a histopatologia é capaz de graduar as lesões de acordo com seu potencial proliferativo (SOUZA ET AL, 2001).

A colposcopia é capaz de detectar lesões precursoras do câncer cervical direcionando as biópsias que são analisadas pelo exame histopatológico. O exame histopatológico pode ser utilizado para confirmar a maioria dos diagnósticos, por meio da observação das características patológicas produzidas pela infecção por HPV como a hiperplasia epitelial, a vacuolização citoplasmática degenerativa em queratinócitos diferenciados com núcleos atípicos (BURD, 2003).

O diagnóstico sorológico da infecção, por meio de partículas semelhantes aos vírus (VLPs), correlaciona bem com a presença do DNA do HPV em amostras cervicais. Dessa forma, a sorologia com base nas VLPs tem sido usada como um marcador de exposição cumulativa ao HPV e na avaliação da eficácia das vacinas (VILLA, 2003; HARPER & WILLIAMS, 2010).

Embora a sorologia identifique indivíduos com infecções virais presentes ou passadas, o risco para o desenvolvimento de NIC em mulheres com HPV 16 é muito menor quando o risco é mensurado com técnicas que detectam o genoma viral (COUTLÉE ET AL, 2005). Como a infecção é seguida de resposta imunológica humoral contra proteínas do capsídeo do vírus, os anticorpos permanecem detectáveis por muitos anos, não sendo capazes de distinguir infecções passadas de presentes (MOYA ET AL, 2006; SZOSTEK ET AL, 2006).

1.4.2 Testes moleculares

Estudos demonstram uma grande variabilidade na sensibilidade e especificidade de diferentes métodos utilizados na triagem do HPV, dependendo da aplicação do método em si, das características da população e da amostra avaliada,

do tipo de lesão e, o mais importante, da quantidade e qualidade do material biológico obtido na coleta.

O papilomavírus humano não pode ser cultivado em laboratório, por isso métodos moleculares são utilizados para detectar o DNA do HPV, a fim de confirmar a presença do genoma viral em amostras clínicas (GNANAMONY ET AL, 2007). Em comparação com o exame colposcópico, o teste molecular é altamente reprodutível e pode ser mais facilmente monitorado e automatizado (COX & CUZICK, 2006).

A grande diversidade de genótipos virais e a incidência de infecções por múltiplos genótipos fazem com que seja necessário o desenvolvimento de métodos mais seguros para identificar os diferentes genótipos em estudos epidemiológicos, bem como no acompanhamento de pacientes (SOTLAR ET AL, 2004).

Atualmente, nenhum teste é oficialmente recomendado para a genotipagem do HPV, por isso vários métodos têm sido utilizados para identificar diferentes tipos virais (MENDEZ ET AL, 2005; VERTERAMO ET AL, 2006; FONTAINE, 2007; LEE ET AL, 2007; MONTALDO ET AL, 2007). Cada técnica molecular utilizada ao longo dos anos tem apresentado vantagens e desvantagens e à medida que uma metodologia se torna bem estabelecida e suas limitações conhecidas, ela pode ser uma ferramenta muito importante (DE VILLIERS, 1997).

1.4.2.1 Hibridização *in situ*

A hibridização *in situ* é uma metodologia que apresenta uma menor sensibilidade e especificidade em relação à reação em cadeia da polimerase (PCR) e à captura Híbrida II (HC2). Trata-se de uma técnica que requer o uso de sondas específicas para cada tipo viral em múltiplas reações. É uma técnica capaz de detectar no mínimo 25 cópias de DNA de HPV ou mais por célula. Porém, as lesões de alto grau, que muitas vezes apresentam pequenas quantidades de DNA viral, são frequentemente caracterizadas como falso-negativas (COUTLÉE ET AL, 2005; BRINK ET AL, 2005; MOLIJIN ET AL, 2005).

1.4.2.2 Captura Híbrida II

A metodologia de captura híbrida tem sido utilizada em muitos estudos e a versão “Captura híbrida de segunda geração” (HC2) tem sido a técnica mundialmente utilizada em laboratórios clínicos. Trata-se de uma técnica de fácil execução, porém, não permite a genotipagem viral, apenas a diferenciação dos vírus de alto ou baixo risco oncogênico, além de uma estimativa da carga viral (BRINK ET AL, 2005; MOLIJIN ET AL, 2005).

O sistema de HC2 é realizado em microplacas e emprega anticorpos na captura do DNA viral com amplificação do sinal, que é detectado por quimioluminescência (BRINK ET AL, 2005; CUSCHIERI ET AL, 2005; MOLIJIN ET AL, 2005).

A técnica é capaz de detectar HPVs de baixo e alto risco oncogênico pela formação de híbridos DNA e RNA. Esta técnica é capaz de identificar os genótipos HPV 6, 11, 42, 43, 44, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 (MENZO, 2008).

1.4.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase

A técnica de PCR, desenvolvida por Kary Mullis, no fim da década de 1980, consiste na replicação *in vitro* de segmentos específicos de DNA pela enzima DNA polimerase (SAIKI, 1988). É uma técnica muito utilizada em estudos epidemiológicos, na detecção viral, na genotipagem e na determinação da carga viral em células esfoliadas, em esfregaços citológicos e em fragmentos de tecido, frescos ou inclusos em parafina (REMMEPRBACH ET AL, 2004; BRINK ET AL, 2005; MOLIJIN ET AL, 2005).

É a metodologia mais sensível e por isso tem sido muito utilizada. O emprego dos iniciadores de consenso, genéricos ou degenerados, dirigidos à região L1 permite a detecção de um amplo espectro de genótipos em uma única reação (COUtlÉE ET AL, 2002; MOLIJIN ET AL, 2005; CARVALHO ET AL, 2010).

A PCR é o método mais comumente usado para a amplificação do DNA do HPV (SNIJDERS ET AL, 2010). A reação envolve três etapas principais:

desnaturação do DNA, anelamento dos iniciadores e extensão. A reação compreende um processo termocíclico no qual são empregados o DNA a ser amplificado, uma DNA-polimerase termo-estável (Taq-polimerase) e uma solução de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) complementares às extremidades de cada uma das fitas (*forward e reverse*) da região alvo do DNA, na presença de Mg^{2+} e de uma mistura de desoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTPs) (SCHOCHETMAN & OU, 1988).

Para a detecção molecular do HPV por PCR, várias combinações de iniciadores genéricos têm sido desenvolvidas e utilizadas para amplificar fragmentos de DNA de diferentes regiões do genoma viral (CHAN ET AL, 2006). Entre os iniciadores, os mais empregados são MY09/11 (MANOS ET AL, 1989), região E1 (GREGOIRE ET AL, 1989), GP5/GP6 (SNIJDERS ET AL, 1990), pU-1m/pU-2R (FUJINAGA ET AL, 1991), GP5+/GP6+ (DE RODA HUSMAN, 1995), SPF10 (KLETER ET AL, 1998), PGMY (GRAVITT ET AL, 2000), LCR-E7 (SASAGAWA ET AL, 2000; SASAGAWA ET AL, 2001), E6CF4/E7CR3 (YAMAGUCHI ET AL, 2002), LC1/LC2 (ASATO ET AL, 2004).

A sensibilidade e a especificidade da PCR podem variar de acordo com o sistema de iniciadores utilizados, o tamanho do fragmento amplificado, as condições de reação e a qualidade da DNA polimerase utilizada na técnica (CASTLE ET AL, 2002), bem como o espectro de genótipos detectados e a capacidade de detecção de infecções múltiplas (IFTNER & VILLA, 2003; FREITAS ET AL, 2007).

1.4.2.3.1 PCR tipo-específica

Na PCR tipo-específica, são utilizados iniciadores desenhados para amplificar um único tipo de HPV, exclusivamente. Trata-se de uma técnica baseada no polimorfismo genético do vírus, principalmente nas regiões de *E6* e *E7*. Entretanto, não estão validados ainda iniciadores específicos para todos os genótipos de HPV. A PCR tipo-específica é de fácil de interpretação e pode caracterizar genótipos virais em casos de infecções múltiplas porém, possui alto custo e alta demanda de tempo (GRAVITT & MANOS, 1992; SOTLAR ET AL, 2004; MOLIJN ET AL, 2005).

1.4.2.3.2 PCR em tempo real

A PCR em tempo real é uma técnica capaz de determinar a carga viral, e o estado físico (epissomal ou integrado) do DNA do vírus. Com iniciadores marcados com moléculas capazes de emitir fluorescência é possível quantificar o DNA e monitorar o acúmulo de amplificações (RODRIGUES ET AL, 2009).

1.5 EPIDEMIOLOGIA: PREVALÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DE HPV

Os genótipos do HPV diferem em sua capacidade de produzir infecção persistente e evoluir para doença neoplásica. Estas diferenças justificam o esforço que tem sido feito para caracterizar a diversidade genética deste vírus em cada região geográfica, bem como a identificação de novos isolados de genótipos específicos de HPV (HAGENSEE ET AL, 2004; CERQUEIRA, 2007).

O Brasil é um país extenso, representando condições sócio-econômicas diversas em diferentes regiões e estados. Com isso, a incidência de câncer varia extensivamente. Enquanto no Norte do país a incidência de câncer cervical esperada para 2010 foi de 23,22 para cada 100.000 mulheres, na região sudeste essa taxa foi menor, cerca de 12,93 (INCA, 2010). Um programa organizado de rastreamento do câncer cervical existe, porém, na prática, muitas vezes é efetuado inadequadamente, salvo em algumas regiões do país, fator que contribui também para essa variação (SILVA ET AL, 2009). As taxas de câncer cervical têm decrescido drasticamente desde a implantação dos programas de rastreamento e procedimentos de acompanhamento de mulheres e adolescentes (VETRANO ET AL, 2007). A maioria dos casos de alta incidência ocorre em países ou regiões em que os programas de rastreamento ainda são ineficientes (SILVA ET AL 2009). No âmbito mundial, em geral, os menores índices de câncer cervical (menores que 15/100.000) ocorrem na região européia (exceto nos países do leste europeu), América do Norte e Japão. Nos países em desenvolvimento, no entanto, os índices são cerca de duas vezes maiores. Na América Latina, por exemplo, esse índice é de 33,5 para cada 100.000 mulheres (PARKIN, 2006).

A variação da prevalência do HPV em todo mundo é explicada pelas diferenças nas metodologias utilizadas para a detecção viral nos estudos, e diferenças nas características das populações estudadas (LANSELINK ET AL, 2008).

O câncer cervical é mais comum em mulheres acima de 35 anos, atingindo o pico de incidência geralmente na faixa etária de 45 a 49 anos. Isto sugere que as infecções pelo HPV ocorram realmente em mulheres mais jovens, mas, as infecções persistentes, provocadas por HPVs de alto risco, são responsáveis pela maioria dos casos que evoluem lentamente durante 10 a 20 anos até o câncer cervical (CAVALCANTI & CARESTIATO, 2006).

A infecção genital pelo HPV é a doença sexualmente transmissível mais comum entre as mulheres sexualmente ativas. Mais de 50% delas já foi ou será infectada por um ou mais genótipos de HPV em algum momento de suas vidas (LANSELINK ET AL, 2008).

Dos HPVs de alto risco associados com o câncer cervical, os genótipos 16 e 18 são encontrados em 70% de todos os cânceres cervicais (LANSELINK ET AL, 2008; OLIVEIRA-SILVA ET AL, 2011)

Em todo o mundo, o HPV 16 é o genótipo mais comum encontrado no câncer cervical, com uma prevalência de 47,7% na África e 69,7% na Europa e América do Norte. Já o HPV 18 é o segundo mais encontrado com uma prevalência de 12,6% na América do Sul e Central e 25,7% no sul da Ásia, sendo mais frequentemente associado ao adenocarcinoma (CLIFFORD, 2003; GALANI & CHRISTIDOULOU, 2009).

Os dois tipos de HPV de baixo risco mais encontrados são os genótipos 6 e 11, comumente presentes em verrugas genitais e lesões intraepiteliais de baixo grau. Tais genótipos são encontrados em mais de 90% de verrugas anogenitais e não estão associados à oncogênese da cérvix uterina (GALANI & CHRISTIDOULOU, 2009).

A coinfeção por múltiplos genótipos de HPV tem sido observada mais frequentemente em mulheres mais jovens e entre aquelas com anormalidades citológicas ou que apresentam uma resposta imunológica deficiente (TROTTIER ET AL, 2006)

Apesar das elevadas taxas de infecção por HPV, as taxas de câncer cervical são apenas moderadamente elevadas em mulheres HIV-positivas. Esta observação pode ser amplamente representada pela eficácia do rastreamento e tratamento do câncer cervical, mas as associações existentes entre o sistema imunológico com a persistência de HPV e o risco de infecção pelo HPV 16, por exemplo, também pode representar fatores relevantes, especialmente nas populações em que o rastreamento do câncer cervical é limitado. No entanto, lesões cervicais neoplásicas permanecem muito comuns em mulheres HIV-positivas, pois tais mulheres vivem mais tempo atualmente com o uso da terapia anti-retroviral altamente ativa (HAART). Além disso, essas mulheres estão inseridas no grupo populacional que apresenta idade na qual o câncer cervical é mais comum (STRICKLER ET AL, 2005).

No Brasil, vários estudos já foram conduzidos a fim de detectar o HPV em mulheres HIV-positivas. Na região central do Brasil, especificamente, o papillomavírus humano foi frequente em 42,7% das mulheres HIV-positivas (CERQUEIRA ET AL, 2007)

1.6 FATORES DE RISCO PARA DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER CERVICAL

Apenas a infecção pelo papillomavírus humano não é suficiente para o desenvolvimento do câncer cervical, sendo necessária a presença de outros cofatores como: idade da sexarca, alta paridade, uso prolongado de contraceptivos orais, tabagismo, imunossupressão ou presença de outra doença sexualmente transmissível em especial a AIDS. Há ainda aspectos relacionados com a resposta imunológica e a genética do hospedeiro além daqueles relacionados ao próprio vírus, tais como, seu genótipo, coinfeção, carga viral e integração viral (PINTO ET AL, 2002; LAU & FRANCO, 2005).

1.6.1 Idade

A idade é um importante fator de risco para infecção pelo HPV. A maioria dos cânceres cervicais inicia-se na junção escamo-colunar, entre o epitélio colunar da endocérvice e o epitélio escamoso da ectocérvice. Neste sítio, contínuas mudanças

metaplásicas são observadas, o risco maior de infecção pelo HPV coincide com a atividade metaplásica mais pronunciada neste local, evento que geralmente ocorre na puberdade e na primeira gravidez, declinando na menopausa. Daí o motivo pelo qual a infecção é mais comum em mulheres sexualmente ativas, entre 18 e 30 anos de idade (CAVALCANTI & CARESTIATO, 2006).

1.6.2 Paridade

A alta paridade aumenta o risco de câncer cervical pelo fato de expor a zona de transformação na ectocérvice por mais anos, contribuindo para exposição direta para o HPV e possivelmente devido a outros fatores. Mudanças hormonais induzidas pela gravidez, como o aumento do nível de estrógeno e progesterona, pode ainda influenciar na resposta imune para o HPV, na persistência e na progressão da infecção (CASTELLSAGUÉ, 2003).

Um estudo multicêntrico da Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC), revelou que mulheres que engravidaram sete ou mais vezes tiveram um risco quatro vezes maior para o câncer cervical, comparadas com mulheres HPV positivas que nunca tiveram filhos (BOSCH ET AL, 2002).

1.6.3 Uso de contraceptivos orais

Dados epidemiológicos sugerem que o uso de contraceptivos orais pode aumentar o risco de neoplasia cervical. Juntamente com a evidência biológica, esses dados indicam que mulheres mais jovens que usam contraceptivos orais estão expostas a um risco maior de desenvolver neoplasia cervical, especialmente se elas também forem expostas ao HPV de alto risco (COELHO ET AL, 2004).

Estudos já demonstraram a presença de altos níveis de receptores hormonais, particularmente de progesterona na neoplasia intraepitelial grau 1, 2 e 3. Receptores de glicocorticóides, dentre outros fatores celulares de transcrição, têm sido identificados como capazes de se ligarem à região regulatória de vários HPVs (LCR) e aumentar o nível de expressão dos oncogenes virais *E6* e *E7* e por

promover a proliferação e eventualmente resultar na transformação celular (PINTO, 2002; COELHO ET AL, 2004).

As evidências mais contundentes com relação a essa associação resultam da análise da Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer que constatou uma forte relação dose–resposta com o aumento do período de uso do contraceptivo. O risco para neoplasia cervical não aumentou em mulheres que usaram o contraceptivo por até 4 anos. No entanto, em mulheres que faziam uso de contraceptivo por mais de 5 anos, essa relação foi significativamente associada com a neoplasia cervical (OR=3,4; 95% CI=2,1 a 5,5). Em mulheres que faziam uso por mais de 5 anos, o risco aumentou em quatro vezes para câncer cervical invasivo (OR= 4,0; 95% CI=2,0 para 8,0) e triplicou para carcinoma *in situ* (CIS) (OR=3,4; 95% CI=2,1 a 5,5) (MORENO ET AL, 2002).

1.6.4 Tabagismo

O tabagismo é também um importante co-fator para o desenvolvimento do câncer cervical. A hipótese de que o fumo é um fator de risco para o câncer cervical foi levantada em 1977 no estudo de WINKELSTEIN. Estudos epidemiológicos em seguida confirmaram a hipótese. O efeito do fumo tem sido avaliado em muitos estudos de caso-controle e alguns têm mostrado uma associação moderada e estatisticamente significativa com relação ao câncer cervical. Muitos estudos relatam o risco estimado entre o hábito de fumar e o câncer cervical de acordo com a intensidade, duração e números de cigarros. Um aumento do risco também está associado com a idade precoce de início do hábito de fumar (PLUMMER ET AL, 2003; GREEN ET AL, 2003).

A magnitude do risco com relação ao fumo está entre 1 a 3 vezes e sua relação tende a ser mais forte na maioria das neoplasias pré-invasivas e em vários estudos uma relação de dose-resposta com a quantidade de tabaco consumido tem sido vista (BOSCH ET AL, 2002).

O fato da nicotina e carcinógenos específicos do tabaco estarem presentes no muco cervical de fumantes fortalece a hipótese da ação sinérgica entre o cigarro e o

HPV no desenvolvimento de lesões epiteliais cervicais de alto grau e no câncer cervical (CASTELLSAGUÉ, 2003; KAPEU, 2009).

Alguns autores defendem que a exposição ao tabaco pode afetar a habilidade de ativar uma resposta imune local efetiva contra infecções virais, já que o fumo pode reduzir o número de células de Langerhans e outros elementos do sistema imune (POPPE ET AL, 1995; CASTELLSAGUÉ, 2003).

Um estudo desenvolvido por GIULIAN ET AL (2002), apresentou uma convincente evidência de que em fumantes, a persistência viral é significativamente mais comum, possuindo também uma menor probabilidade de cura de uma infecção oncogênica do que aquelas mulheres que nunca fumaram.

1.6.5 Imunossupressão ou presença do HIV

Indivíduos imunossuprimidos ou HIV-positivos apresentam um alto risco de infecção pelo HPV. Altos níveis de RNA do HIV e células CD4 em quantidades inferiores a 200 células por mm^3 estão associados com a incidência e persistência da infecção pelo papillomavirus humano. Mulheres com HPV oncogênico e HIV-positivas, com baixa quantidade de células CD4 são mais susceptíveis no desenvolvimento de lesão intraepitelial do que mulheres HIV-negativas com nível normal de células CD4 (STRICKLER ET AL 2005).

O estabelecimento da infecção pelo HPV pode ser modulado por um sistema imune competente. Experimentos *in vitro* têm demonstrado uma associação inversa entre o grau de neoplasia e a produção de interleucina 2 pelas células mononucleares do sangue periférico em resposta aos peptídeos E6 e E7 do HPV 16. Mulheres com NIC III ou câncer parecem ter uma diminuição na habilidade de ativar as células T helper tipo 1 (Th1) mediado pela resposta imune à proteína E6 e E7 do vírus, comparado com mulheres com NIC I ou mulheres infectadas pelo HPV sem lesões cervicais (BOSCH ET AL, 2002).

1.6.6 Presença de múltiplos genótipos virais

Um importante fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical é a infecção causada por mais de um genótipo viral. Já está estabelecido que exista uma forte associação entre o número de genótipos virais no sítio da infecção e a severidade da neoplasia intraepitelial cervical (MEJLHEDE, 2009; DE LEON, 2011). Acredita-se que aproximadamente 20 a 40% das mulheres com infecção causada pelo HPV, apresentam mais de um tipo viral (DE LEON, 2011).

1.7 PERSISTÊNCIA VIRAL DA INFECÇÃO PELO HPV

A infecção pelo HPV é frequentemente assintomática e em muitos casos (70 a 90%) transitória, pois, o vírus é eliminado pelo sistema imune antes dos efeitos patogênicos (MAGGINO ET AL, 2007), porém, o mecanismo em que o sistema imune do hospedeiro age frente à infecção pelo HPV é ainda pouco conhecido (AULT, 2006).

Geralmente as infecções por HPV curam-se em até 7 a 10 meses. Apenas uma pequena porcentagem de mulheres apresenta o risco de desenvolver a infecção persistente, que pode eventualmente causar o desenvolvimento de células anormais, quando não tratadas e não identificadas. Essas células podem mais tarde evoluir para o câncer cervical (MEJLHEDE, 2009).

As infecções causadas por HPV de alto risco oncogênico, chamadas de displasias ou NIC I, são na maioria dos casos eliminadas pelo sistema imune dentro de um a dois anos, sendo indetectáveis mesmo por técnicas sensíveis como a reação em cadeia da polimerase. Entretanto, algumas infecções podem persistir por períodos prolongados, pois não são efetivamente eliminadas pelo sistema imune. Além da presença do HPV de alto risco oncogênico, outros fatores de risco contribuem para a persistência viral (B EGLIN, 2009).

Apenas uma pequena proporção de mulheres com um dado tipo de HPV apresenta o mesmo genótipo em infecções subseqüentes, caracterizando uma condição de persistência viral. Na prática, a persistência pode ser definida como a detecção do mesmo genótipo de HPV duas ou mais vezes por certo período. O risco

de uma neoplasia intraepitelial cervical é proporcional ao número de testes positivos para o HPV, sugerindo que o desenvolvimento carcinogênico resulte de infecções persistentes (FRANCO ET AL, 2001; SCHIFFMAN & CASTLE, 2003).

Assim, a persistência da infecção é um importante fator de risco no desenvolvimento de neoplasias cervicais e progressão do câncer cervical. Estudos epidemiológicos e prospectivos conduzidos em vários países têm demonstrado que o risco de desenvolver o câncer cervical está fortemente associado com a presença e a persistência de papilomavirus humano de alto risco oncogênico, principalmente o HPV 16 (BOSH & SAN JOSÉ, 2003; SILVA ET AL, 2009).

Mulheres que apresentam infecção persistente constituem o verdadeiro grupo de risco para o desenvolvimento do câncer cervical, com um risco relativo de 100 a 300 vezes em relação àquelas que a infecção não teve caráter persistente (SELLORS ET AL, 2003). Neste caso, o HPV pode provocar alterações atípicas no epitélio cervical podendo evoluir para transformação maligna (SCHIFFMAN & CASTLE, 2003).

Os determinantes da progressão clínica da infecção pelo HPV incluem, além da persistência viral, infecção pelo HPV de alto risco oncogênico, alta carga viral e integração do genoma viral no genoma do hospedeiro (COUTLÉE ET AL, 2005).

A infecção pelo HIV e outras situações que resultam em imunossupressão também aumentam o risco da persistência e progressão de lesões cervicais (GALANI & CHRISTDOULOU, 2009).

Alguns estudos têm sugerido um possível papel das infecções por múltiplos tipos de HPV no desenvolvimento e progressão para neoplasia cervical. No entanto, outros têm mostrado que o risco de lesões pré-cancerosas ou câncer invasiva em mulheres com múltiplos tipos não foi maior com relação aquelas que apresentavam apenas um genótipo viral (CHATURVEDI ET AL, 2005; TROTTIER ET AL, 2006).

PERRONS ET AL (2002) mostrou que as pacientes com infecção persistente podem ter um maior risco de adquirir múltiplas infecções.

1.8 EVOLUÇÃO DAS LESÕES PRÉ- NEOPLÁSICAS

O padrão de infecção produtiva pelo HPV é observado nas lesões intraepiteliais de baixo grau e em condilomas acuminado. Nestes tipos de lesões o efeito de E6 e E7 é reduzido pelo aumento da expressão de inibidores de quinases dependentes de ciclinas (Cdks) como p21 e p27, as quais previnem que o ciclo celular avance em G1 e G1/S. No entanto, em alguns casos, o papillomavírus causa uma infecção abortiva a qual o ciclo produtivo do vírus não é completado e as lesões nestes casos podem evoluir para o câncer. Progressão de lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL) para lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL) requer um alto nível de E6 e E7, suficiente para impedir o efeito dos inibidores de Cdk. A expressão contínua de E6 e E7 é necessária para a manutenção do fenótipo de malignidade. Na lesão intraepitelial de alto grau (HSIL) e em cânceres invasivos, os capsídeos virais não são formados, e o genoma viral pode se replicar ativamente nas células pouco diferenciadas ou em baixo número de cópias nas células basais diferenciadas (DOOPRBAR ET AL, 2005; LIZANO ET AL, 2009).

Ao contrário dos HPVs de baixo risco, que permanece na forma epissomal, o genoma viral dos HPVs de alto risco frequentemente integra-se ao genoma celular. A integração tem sido proposta como um mecanismo da progressão de HSIL para o câncer invasivo como mostra a figura 3. A transcrição dos oncogenes virais *E6* e *E7* é naturalmente reprimida pela proteína E2. Porém, a integração do genoma viral envolve a ruptura do genoma circular do HPV, na região de *E2*, interrompendo a sequência deste gene e conseqüentemente a expressão da proteína E2. A redução dos níveis de E2 libera a expressão de E6 e E7, que são essenciais para a progressão para a carcinogênese (LIZANO ET AL, 2009).

As proteínas E6 e E7 alteram a diferenciação celular, reativam a síntese de DNA, estimulam a progressão do ciclo celular e inibem a apoptose. A proteína E6 ativa ou reprime a expressão de múltiplos genes e se liga a numerosas proteínas incluindo E6AP, uma proteína ligase da via de proteólise. O complexo E6/ E6AP liga-se a p53 para que a mesma seja degradada pelo proteassomo. A proteína p53 induz a apoptose e reprime o ciclo celular, em resposta ao estresse genotóxico e ao dano ao DNA. O controle do ciclo celular é exercido por meio da indução da expressão de

p21, o qual é um inibidor de Cdks, componentes necessários para a progressão do ciclo celular. A proteína p53 induz a via intrínseca da apoptose, estimulando a expressão dos genes da família Bcl-2. A perda de p53 leva a uma instabilidade genética e uma rápida progressão para a malignidade. (LIZANO ET AL, 2009).

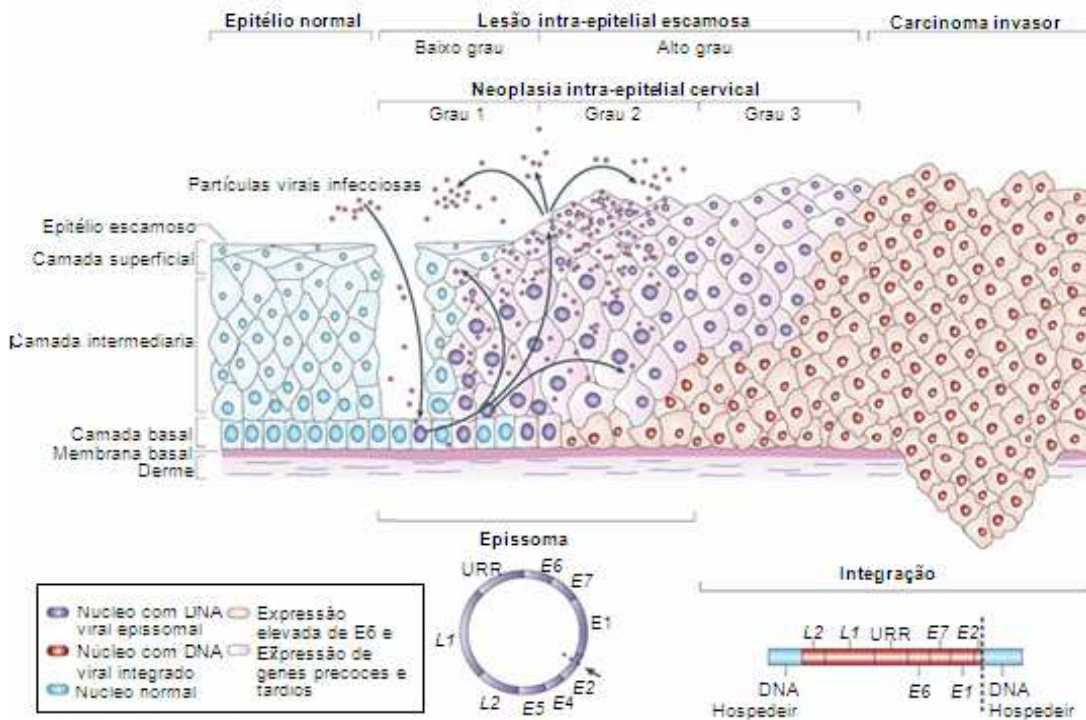


Figura 3. Representação esquemática da progressão da infecção do câncer do colo do útero mediada pelo HPV. As linhas tracejadas representam o principal ponto de quebra do DNA do HPV durante o processo de integração do genoma viral ao DNA da célula hospedeira (Adaptado de Woodman ET AL 2007).

Neste contexto, a proteína E7 do HPV 16 liga-se e inativa a proteína do retinoblastoma (pRb) e promove sua degradação por meio da via do proteossomo. A interação da proteína E7 e pRb na forma hipofosforilada causa a liberação de E2F. A proteína E7 forma um complexo com as proteínas que controlam o ciclo celular, como pRb, p107, p130 e ciclina A. Uma vez que E7 se liga a pRb, o controle do ciclo celular é interrompido, pela perda da função de pRb. (ZUR HAUSEN 2000, LIZANO ET AL, 2009, GHITTONI ET AL, 2010).

Estudos têm demonstrado que a proteína E7 do HPV de alto risco oncogênico parece ter uma maior afinidade com pRb, comparada à proteína E7 do HPV de baixo risco oncogênico (ZUR HAUSEN, 2000; LIZANO ET AL, 2009).

Infecção persistente com um ou mais subtipos de HPV de alto risco oncogênico, ao longo do tempo, desencadeia o desenvolvimento e progressão de NIC. O desenvolvimento progressivo das alterações celulares inicia-se com infecção das camadas basais das células do epitélio. Todo o processo ocorre geralmente durante um período de 10 a 40 anos, embora ele possa ocorrer em apenas um a dois anos em alguns casos. Se a virulência do patógeno, fatores de risco e fatores inerentes aos sistema imune do hospedeiro são características decisivas na velocidade do processo oncogênico continua a ser esclarecida. Os estágios NICI e NICII, em alguns casos, podem regredir naturalmente (GALANI & CHRISTODOULOU, 2009).

1.9 INFECÇÃO POR MÚLTIPLOS GENÓTIPOS DE HPV EM POPULAÇÕES HIV-POSITIVAS E HIV-NEGATIVAS

Os vírus HIV e HPV são transmitidos sexualmente e compartilham fatores de risco comuns. Assim, é coerente que mulheres HIV infectadas tenham uma maior prevalência de infecções cervicais causadas pelo HPV, comparadas as mulheres HIV-negativas (STRICKLER ET AL, 2003; NICOL t al., 2005; VIDELA ET AL, 2009).

Comparados às mulheres HIV-negativas, as mulheres HIV-positivas apresentam também uma maior ocorrência de infecções por múltiplos genótipos de HPV, caracterizando-se por uma diminuição da regressão das lesões de baixo grau e aumento da taxa de progressão da infecção para lesões cervicais de alto grau e câncer, provavelmente, devido à resposta enfraquecida do sistema imune (PALEFSKY, 1999; CERQUEIRA ET AL, 2008). Há alguns estudos na literatura que tiveram como objetivo a detecção de múltiplas infecções em mulheres HIV infectadas ou não, como mostra tabela a seguir:

Tabela 2- Estudos sobre infecções por múltiplos genótipos de HPV em mulheres HIV- positivas e HIV-negativas

Referência	Nº de casos População	Infecção por múltiplos genótipos (%)	Infecção única (%)	Genótipos mais prevalentes	Método utilizado
TANZI ET AL, 2009	172	38,9	24,1	16,6,11,61,53	PCR My09/My11
EREN ET AL, 2010	500	16,5	4,02	16,6,53,59,35	Microarray
MELGAÇO ET AL,2010	140	20	4,5	16, 53, 58	PCR My09/My11
CUSHIERi, ET AL, 2004	3444	10	10	16,18,51,31,52	PCR/Hibridização
CERQUEIRA ET AL,2007	150	31,2	18,75	16,81	PCR/RFLP
MEJHEDE ET AL,,2010	3588	52	48	16	Microarray
DAL BELLO ET AL, 2009	1323	44,2	35,85	16,31,52	PCR My09/My11

A infecção cervical causada por vários tipos de HPV está associada a um risco aumentado para câncer cervical e é mais comum em mulheres coinfectadas HPV/HIV. Da mesma forma, a infecção pelo HIV também está associada com infecção persistente por HPV (DE VUYST ET AL, 2008; BANURA ET AL, 2008; KOSHIOL ET AL, 2006).

Em mulheres HIV-positivas, a prevalência e a distribuição de genótipos de HPV têm sido documentadas de acordo com o grau das lesões do colo do útero. As taxas de persistência e cura das infecções por HPV têm sido avaliadas de acordo com seu potencial patogênico e em pacientes HIV-positivas cirurgicamente tratadas (DE SANJOSE ET AL,2007).

Segundo FIFE ET AL (2001) e TROTTIER (2006), as infecções por múltiplos tipos de HPV parecem agir sinergicamente na carcinogênese cervical. Em contraste, LEVI ET AL (2004) relatou que embora a infecção com múltiplos genótipos de HPV seja um achado frequente em mulheres brasileiras infectadas com HIV, a infecção concomitante com três ou mais tipos de HPV não confere um risco adicional de displasia cervical em comparação com infecções por um único genótipo viral.

MUNOZ ET AL (2003) em seu estudo não encontrou um aumento no risco de câncer cervical associado com infecções múltiplas em um largo estudo internacional.

O papel de infecções múltiplas sobre o risco de lesões no epitélio cervical é avaliado separadamente pelos achados citológicos e pelos diagnósticos histológicos, considerando tanto o número de genótipos virais presentes, quanto seu potencial oncogênico. Os dados também são controlados por inúmeras variáveis como idade, história prévia de lesões, o grau das lesões, e status de HIV (ROUSSEAU ET AL, 2003b; CHATURVEDI ET AL, 2005; TROTTIER ET AL, 2006).

No estudo de DAL BELLO ET AL (2009), o efeito do número de genótipos de HPV no risco de NIC II é altamente significativo, mesmo após a exclusão das biópsias negativas. Ambas as comparações mostram que o risco aumenta linearmente com o número de tipos de infecção independente do potencial oncogênico. Um aumento no risco é observado não apenas para as infecções sustentadas por genótipos de HPV de alto risco, mas também para a associação entre genótipos de baixo e alto risco.

Os possíveis mecanismos pelos quais as infecções múltiplas podem aumentar o risco de lesão intra-epitelial cervical ainda são pouco elucidados. Eles podem se relacionar com fatores comportamentais ou virais, como co-transmissão ou infecção facilitada. No entanto, as mulheres com infecção por um único genótipo viral ou múltiplos genótipos compartilham fatores de risco epidemiológico semelhantes, e os genótipos do HPV são adquiridos e removidos de forma independente, pelo menos, em infecções incidentes (ROUSSEAU ET AL, 2003b; MENDEZ ET AL, 2005; PLUMMER ET AL, 2007).

Alguns estudos com relação à idade, número de parceiros sexuais e frequência de relações sexuais têm demonstrado que a aquisição de um genótipo do HPV é favorecida quando o indivíduo já esteve infectado por outro genótipo viral. Tal fato pode ocorrer devido a um mecanismo biológico pelo qual a aquisição de um genótipo viral, de alguma forma, facilita a aquisição de outro genótipo (KJAER ET AL, 2005; MEJHEDE ET AL, 2010).

Neste contexto, alguns estudos têm sugerido que a presença de certos genótipos do HPV facilita a infecção com outros genótipos. Por exemplo, indivíduos com infecção incidente pelo HPV16 ou 18 apresentam cinco a sete vezes maior probabilidade de adquirir uma infecção posterior pelo HPV58 do que os indivíduos não infectados com o HPV16 ou 18 (MENDEZ ET AL, 2005). Porém, alguns estudos

defendem que as infecções com diferentes genótipos virais ocorrem com o mínimo de interações virais com relação à aquisição, persistência ou cura (PLUMMER ET AL, 2007).

Mecanismos alternativos podem depender da persistência viral ou do aumento da susceptibilidade do hospedeiro. Diferentes tipos de HPV e co-infecção aumentam a duração das infecções prevalentes e incidentes. Assim, uma capacidade diferencial de persistir, pode favorecer o acúmulo de alguns tipos virais ao longo do tempo (RODRIGUEZ ET AL, 2008; TROTTIER ET AL, 2008).

Nos últimos anos, tecnologias que permitem a rápida detecção de vários tipos de HPV têm sido desenvolvidas. Consequentemente o número de estudos mostrando que infecções por múltiplos tipos são comuns tem gradativamente aumentado (MEJLHEDE ET AL, 2009).

Estudos longitudinais feito em homens e mulheres têm mostrado que a detecção simultânea ou sequencial de mais de um genótipo do HPV no mesmo indivíduo é comum e que isso ocorre com maior frequência do que era esperado (LAJOUS ET AL 2005).

1.10 DOENÇA CERVICAL UTERINA EM POPULAÇÕES HIV-POSITIVAS E HIV-NEGATIVAS

A infecção pelo HPV causa aproximadamente 466.000 novos casos e 231.000 mortes devido ao câncer cervical anualmente. Estima-se que mulheres com câncer cervical morrem aproximadamente 18 anos mais cedo em relação àquelas que nunca apresentaram essa patologia (SEGHAL & SINGH, 2009).

O processo de carcinogênese cervical inclui três etapas: infecção pelo HPV, a progressão para lesões pré-invasivas de alto grau e invasão. A maioria das infecções (>95%), incluindo aquelas com citologia anormal, resolvem-se espontaneamente, retornando para a negatividade do DNA viral, não necessariamente passando pelas etapas enumeradas (SEGHAL & SINGH, 2009).

O papilomavírus humano infecta preferencialmente a zona de transformação cervical, que é um ponto de junção das células da endocérvice cervical e das células escamosas de epitélio estratificado da ectocérvice. Esse local está sujeito a

contínuas transformações durante toda a vida da mulher e somado a fatores específicos esta região facilita o desenvolvimento do câncer cervical (GHITTONI, 2010).

A infecção pelo HPV, diferente de muitas infecções genito-urinárias, não é caracterizada com sintomas imediatos, além disso, a maioria das infecções não desenvolve doença clínica ou sintomas pelo fato do sistema imune do hospedeiro resolver a maioria das infecções (MAO, 2003; AULT, 2006). A infecção pelo HPV então tende a ser prolongada e aparentemente silenciosa, tornando este vírus extremamente bem adaptado para infectar seres humanos (GARCIA-CHACON, 2009). Assim, somente a minoria das pacientes com HPV desenvolve sérias complicações clínicas (MAO ET AL, 2003; AULT, 2006).

Embora o papilomavírus de alto risco oncogênico seja uma condição necessária para causar o câncer cervical e sua origem da infecção seja bem elucidada, nem a sistemática e nem o local das respostas imunes a este vírus tem sido bem estudadas ou entendidas (GARCIA-CHACON, 2009). Neste contexto é importante distinguir entre os mecanismos utilizados pelo vírus e aqueles usados por células do tumor para ludibriar o ataque imune (KANODIA ET AL, 2007).

A estratégia da infecção prolongada utilizada pelo HPV é realmente bem-sucedida. Não há viremia, nenhuma fase lítica, não propagação viral para outros tecidos distantes e o fato do sexo masculino ser um propagador viral cujo comportamento sexual é convenientemente utilizado pelo vírus para que o mesmo se espalhe ainda mais entre os seres humanos. De outro ponto de vista, dado que a maioria das mulheres infectadas efetivamente elimina o vírus e só uma minoria continua a insidiosa progressão para o câncer, é possível que possa haver alguns fatores, ainda desconhecidos, nesta pequena população feminina permissivas para o HPV se desenvolver (GARCIA-CHACON, 2009).

O curso natural da fase precoce da infecção pelo HPV até o câncer cervical é claramente assintomático, detectado apenas por meio de testes baseados em citologia ou por meio de metodologias mais elaboradas (GARCIA-CHACON, 2009).

A replicação de DNA viral nas células indiferenciadas e a formação de partículas em células diferenciadas reduz a sua exposição ao sistema imunológico do hospedeiro. A natureza não lítica da infecção pelo HPV limita a produção de

antígenos que são processados e apresentados ao sistema imunológico adaptativo. Além disso, o vírus codifica proteínas não secretoras. A maioria destas, proteínas E, é expressas em níveis baixos, principalmente no núcleo das células infectadas e juntamente com a falta de sinais pró-inflamatórios, a resposta imune do hospedeiro pode não ser ativada (KANODIA ET AL, 2007).

Ao contrário das mulheres HIV-positivas, o sistema imunológico da maioria das mulheres não infectadas pelo HIV consegue eliminar o HPV do tipo oncogênico antes do desenvolvimento da malignidade (KOUTSKY ET AL, 1997). Estudos da história natural do vírus elucidam que a maioria (90%) das neoplasias intraepiteliais de baixo grau podem regredir espontaneamente, pelo fato de que muitas lesões em NIC são induzidas por HPVs não oncogênicos, bem como o desenvolvimento de respostas imunes antígeno específicas. No momento, da regressão espontânea de verrugas genitais infectadas por HPV, as lesões são infiltradas com células T CD8, T CD4 e macrófagos (VAN DER BURG, 2009). Essa observação é coerente com a noção geral de que a resposta imune protetora nas infecções crônicas virais é uma resposta polifuncional tipo 1, por células T CD4 e células T CD8 (ZAJAC ET AL, 1998; VAN DER BURG, 2009).

Em geral, a imunidade tipo específica, por meio das células T CD4 contra o HPV compreende tanto a produção de Th1 (IFN γ) e IL- 5 reativas a uma ampla variedade de epítomos dentro destes antígenos (DE JONG ET AL, 2002). Além disso, estas células T CD4 e células T CD8 circulantes são capazes de migrar da circulação do epitélio após o desafio antigênico em indivíduos saudáveis (HENDE ET AL, 2008). Estas observações sugerem que o sucesso da defesa contra a infecção pelo HPV 16 é comumente associado com a indução de uma resposta sistêmica por células T efectoras contra os antígenos precoces virais (KENTER ET AL, 2009; VAN DER BURG, 2009).

Embora não esteja claro se os marcadores da doença causada pelo HIV constituem fatores de risco na infecção pelo HPV, alguns relatos demonstraram que a contagem de células CD4 e a carga viral do HIV são diretamente correlacionadas com a prevalência do HPV (PALEFSKY, 1999; CERQUEIRA ET AL, 2008) e também com a persistência tipo específico e o aumento de neoplasias associadas ao HPV (AHDIEH ET AL, 2001).

O que se sabe é que nas mulheres HIV-positivas, comparadas com as mulheres não infectadas pelo HIV, a prevalência da infecção pelo HPV é bem mais alta e persistente (OSTER ET AL, 2009). O risco de desenvolverem o câncer cervical nessas mulheres tende a ser cinco vezes maior comparado com a população em geral (TANZI, 2009).

A incidência das lesões cervicais precursoras bem como o câncer é significativamente maior em homens e mulheres HIV-positivos, comparados àqueles que não apresentam o vírus HIV (PALEFSKY, 2003).

Os resultados dos testes de Papanicolaou realizados em mulheres infectadas com o HIV indicam que 20% a 40% apresentam anormalidades cervicais (OSTER ET AL, 2009). De fato, mesmo nas mulheres cujos resultados do teste do Papanicolaou são normais, as anormalidades citológicas desenvolvem mais rapidamente, em 20 a 35% das mulheres HIV-positivas comparadas às mulheres HIV-negativas (OSTER ET AL, 2009; SCHUMAN ET AL, 2003).

Então, desde 1995, as Diretrizes de Tratamento de HIV emitidas pelo Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos e pela Sociedade de Doenças Infecciosas das Américas passaram a recomendar que todas as mulheres infectadas com o HIV deveriam ser submetidas ao rastreamento do câncer cervical (através do Teste do Papanicolaou) duas vezes durante um ano e depois anualmente (ABERG ET AL, 2004), a fim de detectar precocemente o vírus, tratar as lesões cervicais pré-invasivas e com isso impedir a progressão para câncer cervical invasivo.

O risco do câncer cervical não diminuiu desde a introdução da terapia anti-retroviral, destacando a importância do rastreamento do câncer cervical nesta população (ENGELS ET AL, 2006).

1.11 VACINAS

A alta frequência de HPV16 e 18 no câncer cervical e nas lesões pré-cancerosas, levou ao desenvolvimento de vacinas contra as proteínas L1 do capsídeo viral desses genótipos (OLIVEIRA-SILVA, 2011), por meio da tecnologia do DNA recombinante, não tendo em sua composição DNA ou produtos infectantes, e não conferindo a elas a característica de serem infectantes (HARRO ET AL, 2001).

As vacinas aprovadas, a bivalente (Cervarix[®], GlaxoSmithKline) e a quadrivalente (Gardasil[®], Merk Sharp & Dhome) (CHANG ET AL, 2009), conferem proteção contra os genótipos 16 e 18, e contra os genótipos 6, 11, 16 e 18, respectivamente (MAHDAVI e MONK, 2005).

Alguns estudos vêm sendo desenvolvidos com intuito de avaliar a eficácia da vacina. Um estudo de meta-análise encontrou uma eficácia de cerca de 98% na prevenção dos genótipos 16 e 18 relacionados com NIC II e NIC III (THOMISSON, 2008).

Dados preliminares sugerem que a vacina bivalente HPV16 e 18 pode também proteger contra os genótipos relacionados ao HPV16 (31, 33, 35, 52 e 58) e ao HPV18 (39, 45, 59, 68 e 85) (ORTIZ ET AL, 2006).

A duração da eficácia das vacinas ainda é uma questão a ser investigada. Alguns testes permitiram mostrar uma duração de cinco anos para a vacina quadrivalente e de 8,4 anos para a vacina bivalente. A conclusão dos estudos que estão sendo conduzidos é necessária para se obter mais informações a respeito da proteção conferida pelas vacinas (HARPER ET AL, 2010).

Apesar do sucesso do desenvolvimento da vacina anti-HPV, ainda é desconhecido o impacto sobre uma população com alto grau de vulnerabilidade pela imunossupressão, como em pessoas infectadas pelo HIV (PINTO ET AL, 2005).

2 JUSTIFICATIVAS

O presente estudo justificou-se pelas seguintes observações:

- No contexto da AIDS, as mulheres atualmente são infectadas numa taxa maior do que os homens, representando agora a metade da população infectada (Vaz, 2011)
- O estabelecimento de estratégias adequadas para a prevenção e o tratamento de pacientes requer o conhecimento prévio da epidemiologia e da patogênese da infecção pelo HPV tanto na população de mulheres infectadas pelo HIV ou não infectadas;
- Poucos estudos de detecção e genotipagem de múltiplos genótipos de HPV envolvendo mulheres HIV-positivas e HIV-negativas foram realizados em todo mundo, e nenhum estudo molecular para a identificação de múltiplos genótipos em amostras cervicais de mulheres HIV-positivas e HIV-negativas em estudos de caso- controle, foi desenvolvido em Goiânia (CUSHIERI ET AL, 2004; CERQUEIRA ET AL, 2007; DAL BELLO ET AL, 2009; TANZI ET AL, 2009; EREN ET AL, 2010; MELGAÇO ET AL, 2010; MEJHEDE ET AL 2010;
- Estudos demonstram que a presença de múltiplos genótipos do HPV em pacientes HIV-positivas, sendo que em várias delas, as lesões precursoras evoluíram para neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC), justificando assim a necessidade de estudos sobre a detecção dos genótipos virais nestas mulheres (CLIFFORD ET AL, 2006; DAL BELLO ET AL, 2009)
- A identificação de genótipos em uma população específica é de grande importância para o monitoramento de possíveis mudanças nos padrões de distribuição de diferentes genótipos de HPV, bem como fornece uma base de dados e informações que permitem avaliar a epidemiologia da infecção pelo HPV.
- A associação entre o câncer cervical e o HPV é bem conhecida, mas a associação entre o tipo de HPV e grau de lesões intraepiteliais escamosas em pacientes HIV-positivas é ainda incerta.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Comparar a prevalência de infecções por múltiplos genótipos de HPV e de alterações citológicas em dois grupos de mulheres, HIV-positivas e HIV-negativas, da cidade de Goiânia-GO.

3.3 Objetivos específicos

- (1) Descrever a prevalência de alterações citológicas cervicais nos dois grupos de mulheres;
- (2) Determinar a prevalência do genoma do HPV em amostras cervicais, obtidas dos dois grupos de mulheres, utilizando o Kit comercial Linear Array Genotyping Test (Roche Diagnostics);
- (4) Identificar a prevalência de infecções por múltiplos genótipos nos dois grupos.
- (3) Determinar a distribuição dos principais genótipos do HPV nos dois grupos.
- (5) Identificar as possíveis associações entre as alterações citológicas cervicais encontradas com a presença de múltiplas infecções;

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo prospectivo comparativo do tipo caso-controle. Mulheres HIV-positivas e mulheres HIV–negativas (controle) foram comparadas com relação à análise das alterações citológicas, detecção e genotipagem de múltiplos genótipos do HPV. Possíveis associações entre esses parâmetros também foram investigadas neste estudo.

4.2 Encaminhamento e aprovação do projeto pelo Comitê de ética em Pesquisa

O estudo foi realizado após apreciação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás e da Santa Casa de Misericórdia de Goiânia (Anexo nº)

4.3 Seleção das amostras

Para o estudo, foram utilizadas amostras cérvico-vaginais de 57 mulheres HIV-positivas, assistidas pelo CADA (Centro de Apoio ao Doente com AIDS) e de 57 mulheres HIV-negativas, que procuraram o serviço de Ginecologia, para o exame preventivo de Papanicolaou, durante a Semana de Cultura e Cidadania da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, em junho de 2007. Todas as pacientes foram esclarecidas quanto aos objetivos do projeto e quanto à coleta de material biológico. Após serem informadas e concordarem em participar do estudo, as pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1). As mulheres que atenderam ao convite foram encaminhadas para uma entrevista individual com a pesquisadora, na qual responderam a um questionário (Anexo 2). Posteriormente, essas pacientes foram submetidas ao exame ginecológico dos genitais externos e à coleta de material cérvico-vaginal pelos ginecologistas colaboradores do estudo, para exame citológico e detecção do genoma viral.

4.4 Coleta de espécimes cervico-vaginais

No Laboratório da Área da Saúde (LAS) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás e no CADA, em Goiânia, as participantes HIV-negativas e HIV-positivas, respectivamente, foram submetidas ao exame clínico cuidadoso, com inspeção dos genitais externos e da região perianal. A seguir, com uma espátula de Ayre foi coletado material da ectocérvice. Utilizando uma escova de *cytobrush*, com um diâmetro 5 a 8 mm, foi coletado material da endocérvice para exame citológico, realizado pelo método convencional e detecção de HPV. Após a confecção das lâminas, as escovas eram mergulhadas em uma solução-tampão preservadora UCM - *Universal Collection Medium (Digene Corporation)* para posterior pesquisa de DNA de HPV e genotipagem, pelo método de PCR. Quando indicados, exames colposcópicos com ácido acético a 5% e biópsia do colo do útero foram realizados.

O exame citológico negativo ou exibindo anormalidades em células epiteliais escamosas e glandulares (incluindo lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau LSIL, lesão intra-epitelial escamosa de alto grau, HSIL, células glandulares atípicas - provável lesão de alto grau; adenocarcinoma *in situ*, carcinoma escamoso invasor e adenocarcinoma invasor) foi categorizado de acordo com os critérios morfológicos já definidos (SOLOMON & NAYAR, 2004). Os exames citológicos foram realizados no Laboratório Rômulo Rocha, da Universidade Federal de Goiás, sob supervisão da Dra. Sílvia Helena Rabelo Santos, colaboradora do projeto.

4.5 Diagnósticos moleculares

A padronização e execução das técnicas moleculares foram desenvolvidas no Laboratório de Diversidade Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

4.6 Extração do DNA

O material preservado em meio próprio (*Universal Collection Medium - DIGENE*) foi processado para extração de DNA. A extração foi feita utilizando-se o Kit de extração Wizard (Promega) e seguindo o protocolo do fabricante. O material contido na escova foi inicialmente agitado no vórtex por 30 segundos e em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 15 min, a fim de que o sedimento fosse processado.

A esse sedimento foram adicionados 200 µL de solução de lise e 5 µL de proteinase K, seguindo-se a incubação da amostra em banho-maria, à temperatura de 55°C por uma hora. Em seguida, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e nelas adicionou-se 30 µL da solução de precipitação de proteína. As amostras foram agitadas no vórtex por 20 segundos e centrifugadas por 10 min a 14.000 rpm. O sobrenadante contendo o DNA foi então, transferido para um novo micro tubo de 1,5 mL, ao qual foram adicionados 200 µL de isopropanol gelado, misturando-se por inversão e centrifugação a 10.000 rpm por 10 min. Após esse período, o isopropanol foi descartado por inversão e adicionou-se 200 µL de etanol 70%, e misturados por inversão. Novamente, o tubo foi centrifugado, por 10 min a 14.000 rpm e o mesmo foi descartado por aspiração, cuidadosamente. O sedimento em seguida foi seco com papel absorvente. O material contendo DNA purificado foi ressuspendido em 20 µL de solução de hidratação.

4.7 Reação de PCR - Amplificação do DNA viral

O DNA das amostras foi amplificado utilizando o Kit *Linear Array HPV Genotyping Test* (CE- IVD), conforme as orientações do fabricante. Trata-se de um teste qualitativo *in vitro* para a detecção do papilomavírus humano em amostras clínicas. O teste utiliza a amplificação do DNA alvo por meio da PCR, seguida pela hibridização dos amplicons, sendo capaz de detectar 37 diferentes genótipos virais.

Para a detecção do DNA viral, é utilizado um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores PGMY09/11 biotilizados que se ligam ao DNA alvo, de dupla cadeia, amplificando um fragmento de 450 pares de bases. Um controle de adequação da extração e amplificação, com oligonucleotídeos iniciadores adicionais, também biotilizados, compõe a reação a fim de amplificar um fragmento de 268 pb do gene da β-globina humana.

Para evitar possíveis contaminações, as pipetagens dos reagentes da reação de PCR, foram realizadas em câmara de fluxo, previamente limpa com álcool 70% e hipoclorito de sódio a 5,25%. Em seguida, a câmara de fluxo foi irradiada com luz ultravioleta por 15 minutos. Todos os reagentes da PCR foram rapidamente centrifugados e homogeneizados no vórtex e mantidos no gele até a utilização.

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 30 µL, sendo 11,76 µL da solução contida no HPV MMX (Tampão Tris, Cloreto de potássio, < 0,02% de DNA Polimerase Amplitaq[®]Gold, < 0,1% de Enzima Amperase, < 0,001% de dATP, dCTP, dGTP, dTTP, < 0,001% de cada um dos primers e 0,06% de Azida sódica), acrescida de 3,2 µl do Cloreto de Magnésio (> 1%) e 15 µL de cada amostra extraída diluída (1:10) em água milliQ autoclavada. Um controle negativo (Tampão Tris –HCl, EDTA, < 0,002% de RNA de Poli Ra, < 0,05% de azida sódica) e um controle positivo (Tampão Tris-HCl, EDTA, < 0,002% de RNA de Poli Ra, < 0,001% de DNA plasmidial contendo seqüências de HPV, < 0,001% de DNA plasmidial contendo seqüências do gene da β-globina humana, < 0,05% de azida sódica) fornecidos pelo Kit, foram incluídos em todas as amplificações realizadas.

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador *Verity Life Technologies*. A reação de PCR incluiu um ciclo inicial de 95°C, por 13 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação de 95°C por 1 minuto, anelamento a uma temperatura de 55°C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 1 minuto, ao final, foi realizada uma extensão terminal de 5 minutos a uma temperatura de 72°C.

4.8 Hibridização dos amplicons

Os amplicons obtidos pela PCR foram previamente desnaturados, adicionando 30 µL da solução desnaturante em 30 µL do produto amplificado.

As soluções tampão de hibridização e tampão de lavagem foram aquecidas no banho-maria à 53°C. Em seguida, as tiras, previamente identificadas, foram acondicionadas na bandeja de genotipagem, nas quais foram acrescentados 4 mL do tampão de hibridização em cada compartimento da bandeja, contendo a tira. Logo após, o amplicon, já desnaturado, foi adicionado às canaletas da bandeja contendo as tiras.

As tiras na bandeja foram incubadas em banho-maria a 53°C, sob agitação por 30 min. Após essa etapa, a solução de hibridização foi removida mediante aspiração a vácuo. Em cada compartimento da bandeja, foi colocado 4 mL da solução de lavagem, sob agitação manual. Logo depois, a solução de lavagem foi desprezada. Para uma eficiente lavagem das tiras, foram colocados na bandeja 4

mL do tampão de lavagem estrito, repetindo o processo de lavagem. Novamente, essa solução foi aspirada a vácuo. Após a remoção desta solução, foram adicionados 4 mL do conjugado em cada canaleta contendo uma tira, e deixados a temperatura ambiente, sob agitação por 30 min. O conjugado foi lavado rapidamente com 4 mL de solução de lavagem, à temperatura ambiente sob agitação manual e depois o mesmo foi removido por aspiração a vácuo. A lavagem foi repetida por mais duas vezes por 10 min, à temperatura ambiente.

Em seguida foram adicionados 4 mL de citrato de sódio em cada canaleta da bandeja, sob agitação por 5 min, à temperatura ambiente. Depois, o citrato foi aspirado e adicionou-se 4 mL da solução de revelação (substrato) à temperatura ambiente. A bandeja foi coberta, para evitar que a solução reveladora entrasse em contato com a luz comprometendo a coloração das tiras, e ficou sob agitação por 5 minutos à temperatura ambiente. Terminada essa etapa, as bandas nas tiras tornaram-se visíveis. Foi aspirada a solução reveladora e lavada com água deionizada para remoção do excesso da solução reveladora. Cada tira, então, foi seca à temperatura ambiente e lida visualmente, comparando o padrão de bandas fornecido pelo fabricante do kit. As etapas da hibridização foram esquematizadas na Figura 4.

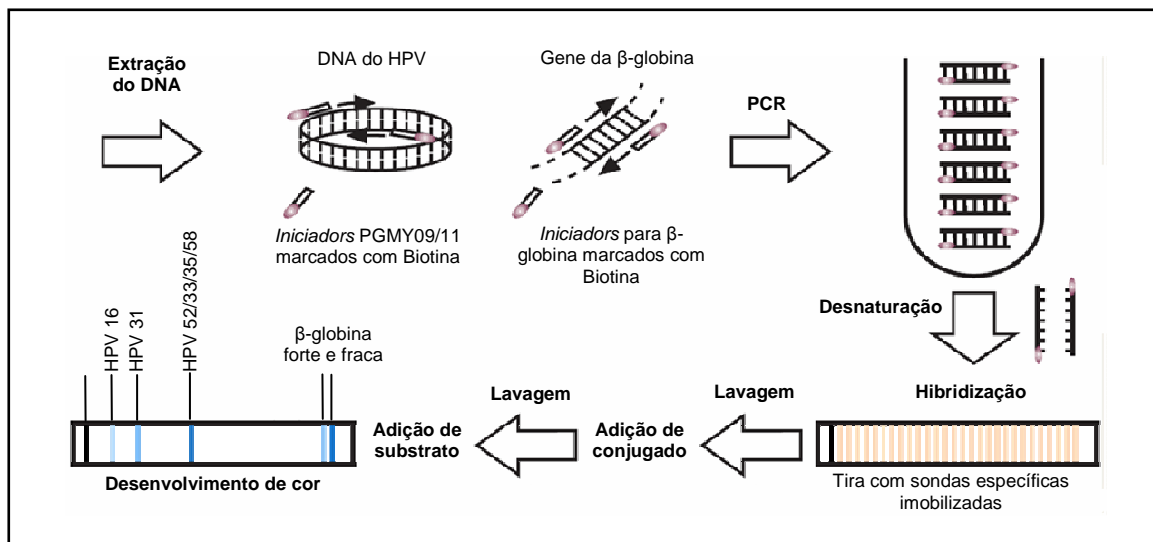


Figura 4. Representação esquemática das principais etapas envolvidas na genotipagem do HPV através da hibridização reversa do produto de PCR baseada no sistema de *iniciadores* PGMY09/11 marcados com biotina

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Um banco de dados foi criado, utilizando o programa *Microsoft Excel 2002*, contendo todos os dados sócio-demográficos, comportamentais e clínico-patológicos das mulheres avaliadas neste estudo. A estatística descritiva com suas respectivas frequências foi realizada para as variáveis relativas às características sócio-demográficas, comportamentais e clínico-patológicas das amostras obtidas. O teste do *qui-quadrado* com correção de Yates, nível de significância de 5% e intervalo de confiança de 95%, além do teste t *student* foram usados para avaliar as possíveis diferenças entre os aspectos sócio-demográficos, comportamentais e clínico-patológicos, no grupo de mulheres HIV-positivas e mulheres HIV-negativas.

6 RESULTADOS

O exame citológico mostrou que de um total de 114 mulheres, 94 (82,4%) apresentaram citologia normal e 20 (17,6) apresentaram anormalidades citológicas como mostra a Figura 5. Das mulheres que apresentaram anormalidades citológicas em 13 (10,8%) detectou-se lesões precursoras do câncer cervical (HSIL e LSIL) e em 7 (6,8%) detectou-se ASCUS.

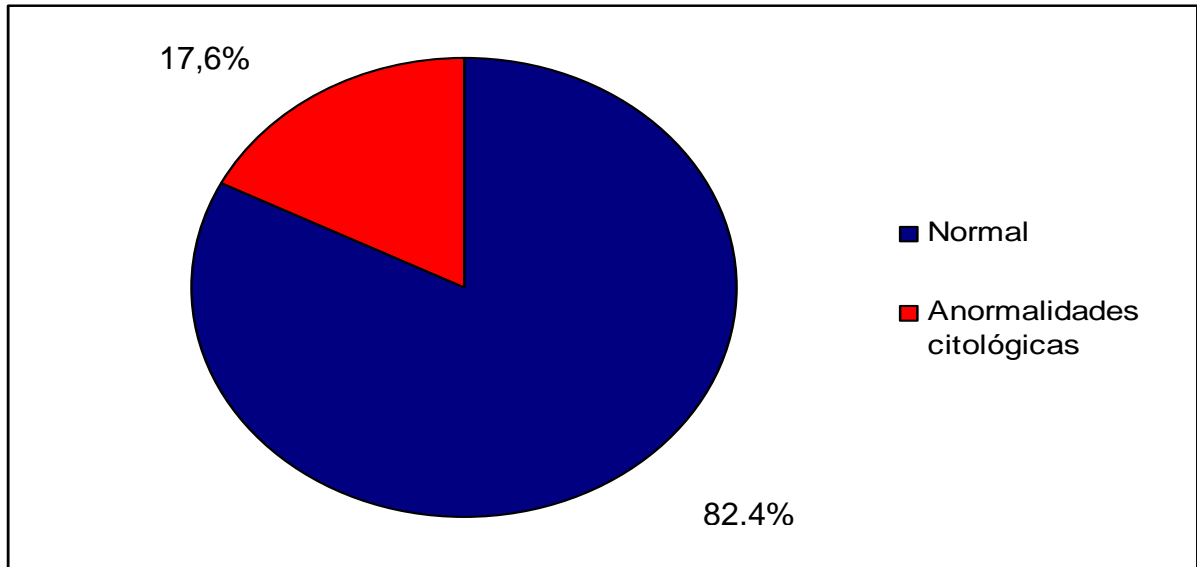


Figura 5: Gráfico mostrando a prevalência dos resultados citológicos observados nas mulheres participantes do estudo.

Dentre as amostras cervicais das mulheres analisadas, independente da presença do HIV, 51 (44,7%) mulheres apresentaram o genoma do HPV.

6.1 Descrição dos dois grupos de mulheres: HIV-positivas e HIV-negativas

As características sócio-demográficas e comportamentais das pacientes estudadas são mostradas na Tabela 3. Os dois grupos se mostraram bastantes semelhantes com relação a algumas características, porém, diferenças significativas foram observadas entre eles. A média de idade das mulheres HIV positivas foi de 35 anos, enquanto que a média para as mulheres HIV negativas foi de 39 anos. As diferenças entre as médias de idade não foram significativas.

Dentre as variáveis sócio-demográficas, foram observadas diferenças significativas em relação ao estado civil ($p=0,01$) das pacientes. Das solteiras 66%

eram HIV-positivas e 34% eram das HIV-negativas. O estado civil “casada” foi considerado um fator de proteção com relação à infecção pelo HIV ($p=0,01$), pois 61,1% das mulheres casadas eram HIV-negativas, enquanto 38,9% eram HIV-positivas.

A renda familiar foi outro aspecto divergente entre os grupos estudados, sendo que 63,3% das mulheres que ganhavam menos que um salário mínimo eram HIV-positivas, enquanto que 76,7% das mulheres que ganhavam de um a três salários mínimos eram HIV-negativas ($p=0,001$). Com relação à escolaridade, 65,5% das mulheres que não completaram o ensino fundamental eram HIV-positivas, comparadas a 34,5% das HIV-negativas. Por outro lado, 68,9% das mulheres que completaram o ensino médio eram HIV-negativas comparadas a 31,1% no grupo HIV-positivo ($p=0,001$).

Quanto aos hábitos sexuais, diferenças significativas foram observadas entre os grupos com relação à história de prostituição, sendo que 90,9% das mulheres que relataram ser profissionais do sexo eram HIV-positivas ($p=0,004$). Esta observação sugere que a prostituição aumentou onze vezes o risco de infecção pelo HIV, comparadas às mulheres que não apresentaram histórico de prostituição [OR=11,915; IC 95% (1,471-96,512)].

Quando os dois grupos foram comparados com relação ao número de parceiros sexuais, observou-se que dentre as mulheres que relataram ter de 1 a 3 parceiros sexuais, 62,7% eram HIV-negativas. Dentre as mulheres que relataram ter de 4 a 10 parceiros sexuais, 57,1% eram HIV-positivas. Um risco duas vezes maior para a infecção pelo HPV foi observado para as mulheres que tiveram de 4 a 10 parceiros, comparadas às mulheres que apresentaram de 1 a 3 parceiros sexuais ($p=0,043$) [OR= 2,242; IC 95% (1,000-5,028)]. Dentre as mulheres que tiveram mais de 10 parceiros sexuais, 84,6% eram HIV-positivas, apresentando um risco nove vezes maior para a infecção pelo HIV ($p< 0,05$) [OR= 9;250; IC95% (1,874-45,649)].

Com relação à idade na primeira relação sexual, a média de idade no grupo de mulheres HIV-positivas foi de 16 anos, variando de 12 a 22 anos, enquanto que no grupo de mulheres HIV-negativas, a média foi de 18 anos, variando de 13 a 31 anos. Uma diferença significativa foi observada entre os dois grupos ($p=0,001$). O tabagismo foi outra característica comportamental que apresentou diferença

significativa entre os dois grupos ($p=0,018$). Dentre as mulheres que fumavam, 69% eram HIV-positivas. O consumo de álcool não mostrou diferença significativa entre os dois grupos estudados.

Tabela 3: Análise univariada das características sócio-demográficas e comportamentais avaliadas para os dois grupos estudados

Variável	Grupos				p	** IC 95%
	HIV negativo		HIV positivo			
	N	%	N	%		
Idade Média (anos)	39		35		0,069	
Estado Civil						
Solteira	17	34	33	66		1
Casada	22	61,1	14	38,9	0,013*	0,328 (0,135-0,798)
Outros	18	64,3	10	35,7	0,01*	0,286 (0,109-0,755)
Renda familiar						
menor que 1 salário	29	36,7	50	63,3		1
1 a 3 salários	23	76,7	7	23,3	<0,001*	0,205 (0,084-0,497)
Acima de 3 salários	5	100	0	-	-	-
Escolaridade						
Ensino fundamental incompleto	20	34,5	38	65,5		1
Ensino fundamental completo	6	54,5	5	45,5	0,208	0,439(0,119- 1,617)
Ensino médio completo ou acima	31	68,9	14	31,1	0,001*	0,238 (0,103- 0,546)
Paridade	2 (0-10)		2,5 (0 -7)		0,091	
Idade da 1ª relação sexual	18 (13-31)		16 (12-22)		<0,001*	
N. de parceiros sexuais						
1 a 3	37	62,7	22	37,3		1
4 a 10	18	42,9	24	57,1	0,048*	2,242 (1,000- 5,028)
mais de 10	2	15,4	11	84,6	0,005*	9,250 (1,874-45,649)
História de prostituição						
Não	56	54,4	47	45,6		1
Sim	1	9,1	10	90,9	0,004*	11,915 (1,471-96,512)
Tabagismo						
Não	48	56,5	37	43,5		1
Sim	9	31	20	69	0,018*	2,883 (1,177-7,062)
Etilismo						
Não	41	50,6	40	49,5		1
Sim	16	48,5	17	51,5	0,836	1,089 (0,485- 2,448)

*Resultados com diferença significativa entre as características analisadas e os grupos estudados

** IC: intervalo de confiança

6.2 Prevalência de anormalidades citológicas cervicais

A Figura 6 indica a prevalência de anormalidades citológicas das amostras cervicais obtidas dos dois grupos de mulheres analisadas neste estudo. A citologia

apresentou-se normal em 94,7% (54/57) das mulheres HIV-negativas e em 70,1%(40/57) das mulheres HIV-positivas. Nenhuma mulher HIV-negativa apresentou LSIL, porém, 10,5% (6/57) mulheres HIV-positivas apresentaram tal lesão. Em 1,7% (1/57) e 10,5% (6/57) das mulheres com HSIL, eram HIV-negativas e HIV-positivas respectivamente.

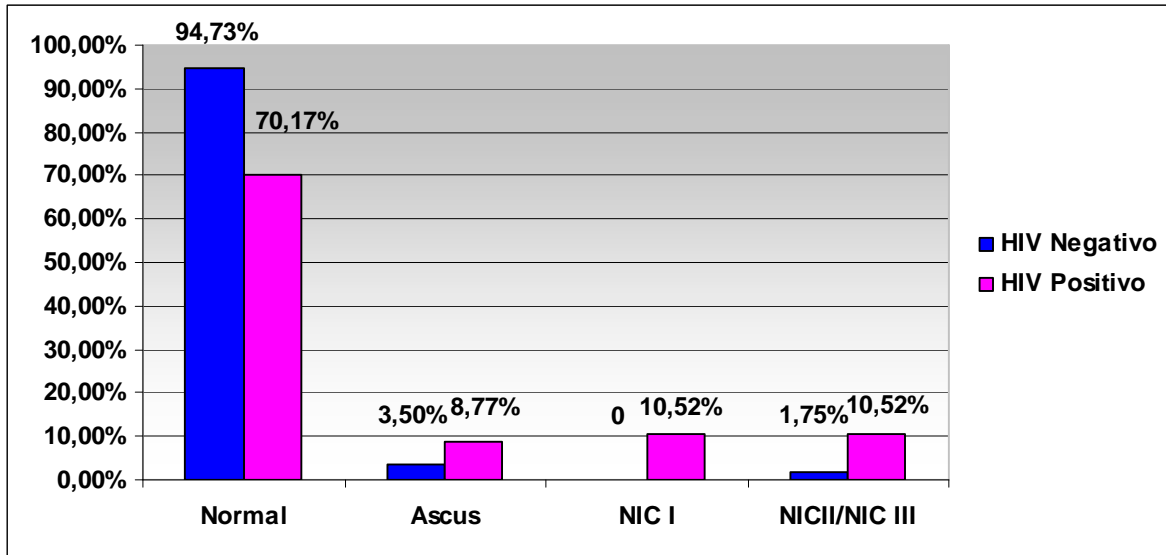


Figura 6: Prevalência de anormalidades citológicas das amostras cervicais obtidas dos dois grupos de mulheres analisadas

Com relação as anormalidades citológicas, não houve diferença estatística entre os dois grupos estudados, como aponta a Tabela 4.

Tabela 4: Análise univariada segundo as anormalidades citológicas dos grupos estudados.

Variável	Grupos		P	OR IC 95%	
	HIV negativo	HIV positivo			
	n	%	n	%	
Citologia					
Normal	54	94,7	40	70,1	1
ASCUS	2	3,5	5	8,8	0,276
LSIL	0	-	6	10,5	-
HSIL	1	1,7	6	10,5	0,069
	57		57		8,100 (0,938-69,965)

6.3 Prevalência de infecção por HPV

A infecção pelo HPV foi mais frequente no grupo de mulheres HIV-positivas (59,6% vs 29,8%, p=0,003) ([OR = 3,5; IC 95% (1,601-7,557)], ou seja, a infecção

pele HIV está associada a um risco 3,5 vezes maior de infecção pelo HPV (Figura 7).

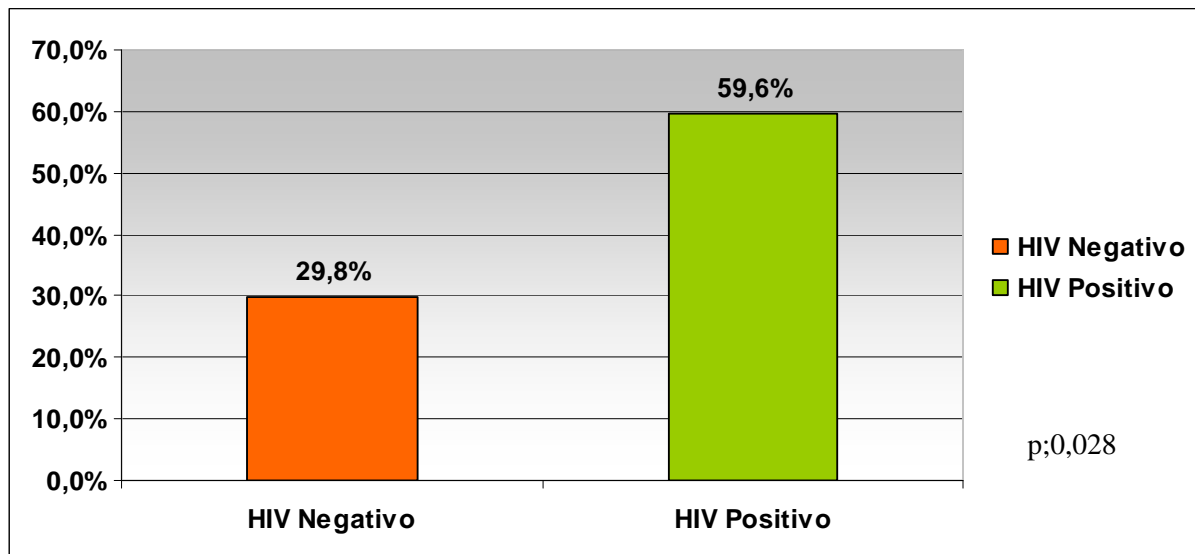


Figura 7: Gráfico mostrando a prevalência de infecções pelo HPV em mulheres HIV-negativas e HIV-positivas.

6.4 Prevalência de infecções por múltiplos genótipos de HPV

A infecção por vários genótipos foi mais frequente no grupo de mulheres HIV-positivas (88,2% vs 58,8%, $p=0,028$), com uma média de 3,1 genótipos/ paciente (variação de 1 a 7 genótipos) no grupo HIV-positivo e 2 genótipos/ paciente (variação de 1 a 4 genótipos) no grupo de mulheres HIV-negativas conforme demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5: Análise descritiva das características das amostras cervicais em relação à presença de múltiplos genótipos de HPV

Parâmetros	Mulheres HIV-positivas n:34		Mulheres HIV-negativas n:17	
	n	%	n	%
Presença de apenas 1 tipo viral				
Apenas tipo oncogênico	2		5	
Apenas tipo não oncogênico	2		2	
Total	4	11,8	7	41,8
Presença de múltiplos tipos				
Tipo oncogênico/ tipo não oncogênico	12		4	
Apenas tipo oncogênico	12		4	
Apenas tipo não oncogênico	6		2	
Total	30	88,2	10	58,8

6.5 Análise descritiva dos genótipos virais detectados de acordo com o potencial oncogênico

A genotipagem do HPV foi realizada por meio da técnica de hibridização reversa em linhas utilizando um Kit comercial capaz de detectar 37 genótipos virais em células cervicais. O HPV16 foi o genótipo mais frequente em ambos os grupos, e foi detectado em 13 (22,3%) pacientes HIV-positivas e em 4 (17,39%) mulheres HIV-negativas. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi detectada entre os genótipos detectados nos dois grupos, como mostram as Tabelas 6 e 7.

Tabela 6: Distribuição dos genótipos de HPV de alto risco detectados nas mulheres HIV- positivas e HIV -negativas.

HPV Alto risco	Mulheres HIV- positivas		Mulheres HIV- negativas		P
	N	%	N	%	
16	13	22,03	4	17,39	0,767
18	5	8,47	2	8,69	1
31	0	0	0	0	-
33	4	6,77	0	0	0,572
35	5	8,47	1	4,34	1
39	1	1,69	0	0	1
45	2	3,38	1	4,34	1
51	2	3,38	1	4,34	1
52	5	8,47	3	13,04	0,68
53	6	10,16	2	8,69	1
55	1	1,69	2	8,69	0,188
56	2	3,38	1	4,34	1
58	6	10,16	1	4,34	0,666
59	0	0	1	4,34	0,28
66	3	5,08	3	13,04	0,349
68	3	5,08	1	4,34	1
82	1	1,69			1
Total	59	100	23	100	-

Tabela 7: Distribuição dos genótipos de HPV de baixo risco detectados nas mulheres HIV- positivas e HIV –negativas

HPV Baixo risco	Mulheres HIV - positivas		Mulheres HIV – negativas		p
	N	%	N	%	
6	5	14,7	3	17,64	0,181
11	2	5,88	0	0	1
26	0	0	0	0	-
40	4	11,76	0	0	0,575
42	3	8,82	0	0	1
44	0	0	0	0	-
54	0	0	1	5,88	0,196
61	5	14,7	2	11,76	0,614
62	3	8,82	1	5,88	1
64	0	0	1	5,88	0,196
67	0	0	0	0	-
69	2	5,88	0	0	1
70	3	8,82	0	0	1
71	5	14,7	0	0	0,571
72	2	5,88	0	0	1
73	0	0	0	0	-
81	1	2,94	0	0	1
83	4	11,76	1	5,88	1
84	2	5,88	2	11,76	0,169
CP6108	3	8,82	0	0	1
IS39	1	2,94	0	0	1
Total	45	100	11	100	-

Do total de 104 genótipos identificados no grupo das mulheres infectadas com HIV, 56,7% são genótipos de alto risco oncogênico. Já nas mulheres não infectadas pelo HIV, foram detectados 34 genótipos, sendo 67,6% genótipos de alto risco oncogênico, conforme especificado na Figuras 8.

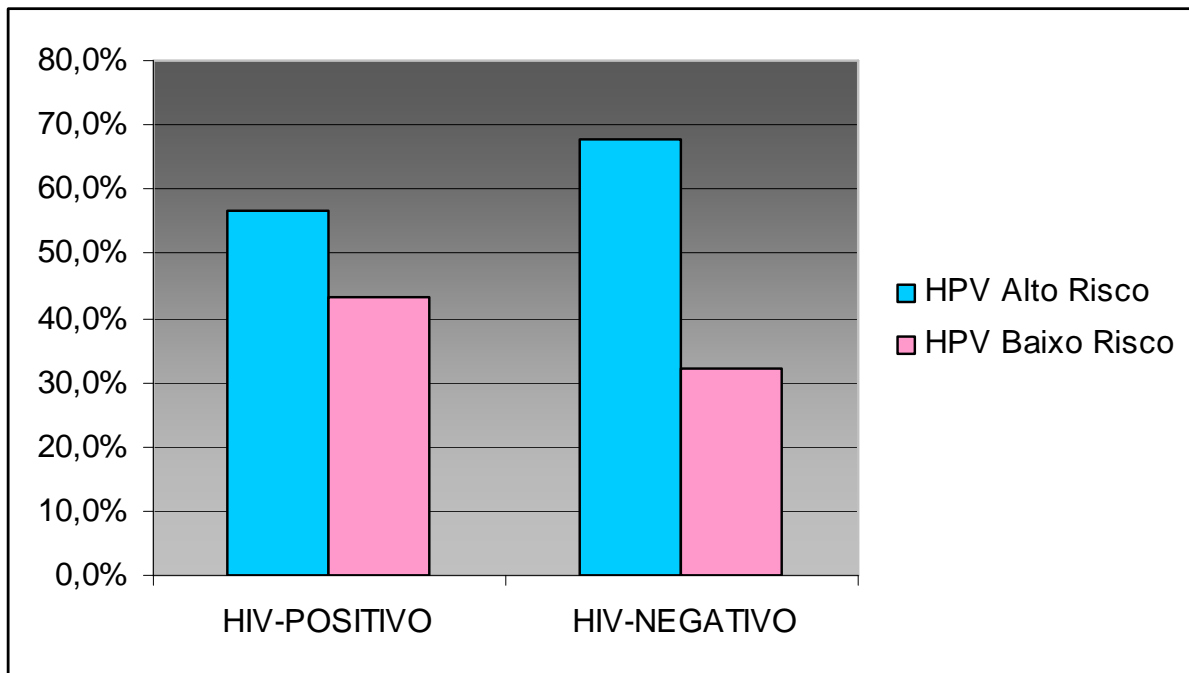


Figura 8: Gráfico mostrando a prevalência de HPV de alto e baixo risco oncológico nas mulheres HIV-negativas e mulheres HIV-positivas.

Não houve diferença significativa ($p= 0,260$), quando se comparou o potencial oncológico do HPV nos dois grupos avaliados .

6.6 Distribuição dos genótipos de HPV

A Figura 9 mostra uma visão geral da distribuição dos genótipos identificados nos dois grupos estudados. No grupo das mulheres infectadas com o HIV, os principais genótipos encontrados foram o HPV 16, 58, 52 e o 33. Já nas mulheres não infectadas pelo HIV, os principais genótipos encontrados foram o HPV 16, 52, 66, 55 e o 18. Nota-se que alguns genótipos foram detectados em apenas um dos grupos, ou seja, os genótipos HPV 39, 82, 11, 40, 33, 42, 69, 70, 71, 72, 81, CPC108 e IS39 foram detectados somente nas mulheres HIV-positivas, enquanto os genótipos HPV59, 54 e 64 forma detectados somente em mulheres HIV-negativas.

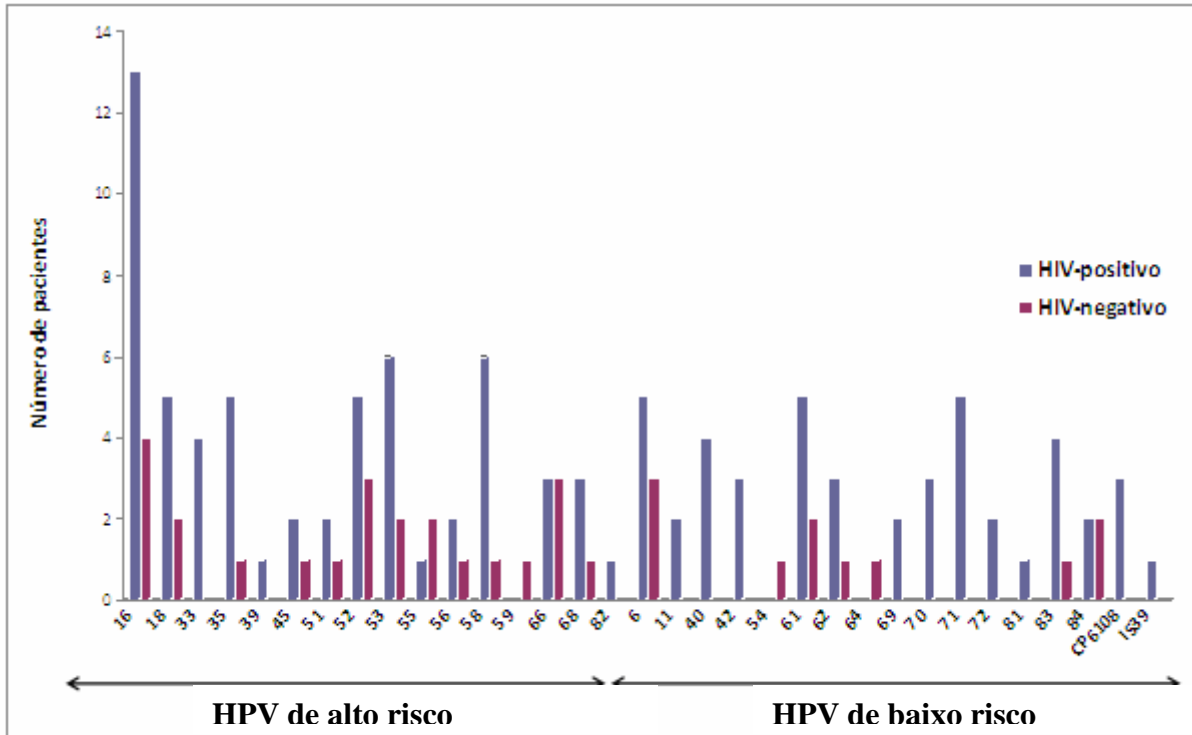


Figura 9: Distribuição dos genótipos detectados nas mulheres HIV-negativas e HIV-positivas

6.7 Associações entre as anormalidades citológicas e infecção por qualquer tipo de HPV e por tipos de alto risco

Os resultados das possíveis associações entre as anormalidades citológicas e infecção por tipos de alto risco das mulheres avaliadas neste estudo encontram-se descritas na Tabela 8 para as mulheres HIV-positivas e na Tabela 9 para as HIV-negativas. No grupo de mulheres HIV-positivas, não houve associação estatisticamente significativa em relação à infecção por HPV de alto risco oncogênico, e presença de anormalidades citológicas, ou seja, na população estudada, a infecção pelo HPV de alto risco oncogênico, tanto por um único genótipo, como por múltiplos genótipos, não mostrou uma associação estatisticamente significativa com a ocorrência de anormalidades citológicas. Porém, com relação à infecção tanto por HPV de alto e baixo risco oncogênico (qualquer tipo), esta associação foi estatisticamente significativa ($p=0,007$).

Tabela 8: Associação entre anormalidades citológicas e infecção por qualquer tipo de HPV e por tipos de alto risco oncogênico em mulheres HIV-positivas

Parâmetros	Anormalidades Citológicas		P	OR/IC
	ausente	presente		
Infecção pelo HPV	Ausente	21	2	1
	Presente	19	15	0,007
8,289 (1,673 - 41,083)				
HPV de alto risco	Ausente	11	10	1
	Presente	8	5	0,601
0,688 (0,168 - 2,81)				

Nenhuma associação estatisticamente significativa foi observada nas mulheres HIV-negativas em relação a infecção por HPV e anormalidades citológicas. Neste grupo a infecção pelo HPV de alto risco oncogênico, tanto por um único tipo, como por múltiplos tipos, também não mostrou uma associação estatisticamente significativa com a ocorrência de anormalidades citológicas.

Tabela 9: Associação entre anormalidades citológicas e infecção por qualquer tipo de HPV e por tipos de alto risco oncogênico em mulheres HIV-negativas

Parâmetros	Anormalidades Citológicas		P	OR/IC
	ausente	presente		
Infecção pelo HPV	Ausente	35	1	1
	Presente	16	1	0,548
3,684 (0,313- 43,321)				
Tipos de alto risco	Ausente	7	1	
	Presente	9	0	0,470

6.8 Associações entre anormalidades citológicas e o número de genótipos de HPV

A Tabela 10 indica os resultados citopatológicos em relação a quantidade de genótipos detectados nos dois grupos avaliados. No grupo de mulheres HIV-positivas a maior prevalência de lesões cervicais de alto grau (HSIL) foi observada em mulheres com apenas 2 genótipos virais 66,7% (4/6). Já os demais casos, 16,7% (1/6) foram observados em mulheres com 4 e mais de 5 genótipos, respectivamente.

No grupo de mulheres HIV-negativas, nenhuma paciente apresentou HSIL. Uma vez que neste grupo entre as mulheres que apresentaram HPV, apenas uma

paciente apresentou lesão, do tipo ASCUS, as demais lesões ocorreram em mulheres em que o HPV não foi detectado.

Nas mulheres HIV-negativas, cerca de 43,7% apresentaram exame citológico normal, com apenas um tipo viral, enquanto que 56,2% apresentaram múltiplos tipos virais. Apenas uma paciente apresentou a alteração citológica ASCUS, sendo que nesta paciente foram detectados três tipos virais, compreendendo dois tipos com provável risco oncogênico e um tipo não oncogênico.

Nas mulheres HIV-positivas, múltiplos tipos virais foram encontrados em 89,4% das mulheres que apresentaram exame citológico normal, enquanto que apenas um tipo viral foi encontrado em 10,5% das mulheres com citologia normal. Das três pacientes que apresentaram HPV, todas apresentaram ASCUS, sendo que uma paciente (33,3%) apresentou apenas um tipo viral, enquanto, duas pacientes (66,7%) apresentaram múltiplos tipos virais (quatro e cinco genótipos, respectivamente). Dentre as seis pacientes que apresentaram LSIL, 16,6% apresentaram infecção por apenas um tipo viral e 83,3% apresentaram lesão com múltiplos tipos virais. Todas as mulheres que apresentaram HSIL tiveram infecção por múltiplos tipos virais.

TABELA 10: Infecções pelo HPV conforme o número de genótipos detectados e o resultado citológico nos dois grupos avaliados

		Mulheres HIV positivas n:57				Mulheres HIV negativas n:57				
		Resultado citológico				Resultado citológico				
nº genótipos	n	normal	ASCUS	LSIL	HSIL	n	normal	ASCUS	LSIL	HSIL
1	4	2	1	1	0	7	7	0	0	0
2	11	6	0	1	4	5	5	0	0	0
3	8	8	0	0	0	3	2	1	0	0
4	5	2	1	1	1	2	2	0	0	0
5	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0
>5	4	1	0	2	1	0	0	0	0	0

7 DISCUSSÃO

Embora esteja elucidado que a maioria das neoplasias cervicais se desenvolvem devido a presença da infecção pelo HPV, pouco se sabe sobre a influência das infecções por múltiplos genótipos virais na carcinogênese cervical. A maioria dos estudos epidemiológicos conduzidos até o momento que abordam infecções causadas por múltiplos tipos virais, geralmente analisaram um número limitado de genótipos.

Atualmente existe uma falta de consenso na literatura sobre a extensão e as implicações de infecções causadas por único tipo de HPV e por múltiplos tipos virais (CLIFFORD ET AL, 2005). A genotipagem do HPV é importante não só clinicamente para o estabelecimento do monitoramento de um determinado paciente, mas também para conhecer os genótipos virais circulantes na população, orientando o desenvolvimento de programas de prevenção da infecção pelo HPV e do câncer cervical.

Ao longo dos últimos anos, conclui-se que a genotipagem do HPV é importante na compreensão da carcinogênese cervical. Vários grupos têm procurado um teste de genotipagem eficaz, devido à sua grande contribuição no diagnóstico de infecções e para uma melhor compreensão da relação do HPV com a carcinogênese, além de contribuir no desenvolvimento de vacinas de tipo específico.

Uma falta de consenso na literatura sobre as implicações de infecções múltiplas causadas pelo HPV é evidenciada em vários estudos de pacientes HIV positivos. Indivíduos HIV-positivos são frequentemente infectados com vários tipos de HPV, sendo tais infecções relatadas em até 80% dessa população. Porém, a prevalência de múltiplos genótipos tende a variar de acordo com a região geográfica, o método de detecção utilizado no estudo e a população selecionada (CUSCHIERI ET. AL, 2004).

Alguns autores defendem que em espécimes contendo múltiplos tipos, verifica-se a amplificação preferencial de alguns genótipos, o que gera resultados imprecisos que subestimam a prevalência da infecção e principalmente da infecção por mais de um tipo (COUTLÉ ET AL, 2002; IFTNER & VILLA, 2003). Estudos que

avaliaram diferentes sistemas de iniciadores na detecção de tipos-específicos de HPV sugerem que para identificar todas as amostras infectadas com HPV é necessário o uso de mais de um sistema de detecção simultaneamente (HUSNJAK ET AL, 2000, KADO ET AL, 2001).

Neste estudo, utilizou-se uma metodologia de detecção de múltiplos genótipos e o número de diferentes genótipos foi relevante. Nossos achados demonstram a presença de vários genótipos, em diferentes combinações em ambos os grupos avaliados. Entretanto, as mulheres HIV-positivas, apresentaram uma maior frequência de combinações dos diversos genótipos pesquisados. Não foi possível avaliar se uma infecção anterior com algum tipo de HPV afetou ou influenciou no risco de aquisição de tipos de HPV subsequentes, já que o estudo compreendeu apenas uma coleta da amostra cervical por paciente em um dado momento.

A incidência de infecções com múltiplos genótipos de HPV em populações femininas tem sido relatada em vários estudos (CLIFFORD ET AL, 2005), com uma frequência de infecções múltiplas variando de 11,5%, na Itália, a 42,4%, no Vietnã (RONCO ET AL, 2005). Estudos recentes no norte e sul da Itália encontraram frequências altas, variando de 30 a 50% (GARGIULO ET AL, 2007; CAPRA ET AL, 2008). No estudo de VIDELA ET AL (2009), a infecção por múltiplos tipos ocorreu em mais de 40% das mulheres, em geral.

Os achados deste trabalho demonstram que a infecção pelo HIV pode desempenhar um papel importante na aquisição de múltiplos tipos de HPV, já que nesta população a presença de múltiplos genótipos foi mais prevalente (88,2%) comparada às mulheres que não apresentaram o vírus HIV (58,8%) ($p=0,028$).

No estudo de LEVI ET AL (2002), detectou-se a presença de múltiplos genótipos em 78,9% das mulheres HIV-positivas. Em seguida, em um outro estudo, LEVI ET AL (2004) observou também uma prevalência mais alta de infecção múltipla do HPV em mulheres HIV-positivas, quando comparadas às mulheres HIV negativas, sendo que, 45% das mulheres HIV-positivas apresentaram infecção múltipla. Entretanto, tal condição não conferiu risco adicional para alterações citológicas em comparação às infecções causadas por apenas um tipo ou dois de HPV, e nem se relacionou com a gravidade da imunossupressão.

Na investigação de CHATURVEDI ET AL (2005), o HPV foi detectado em 42,7% das mulheres HIV infectadas na região central do Brasil. As mulheres HIV-positivas apresentaram uma prevalência significativamente maior de tipos de alto risco oncogênico, baixo risco oncogênico e múltiplos genótipos de HPV. Os HPVs de baixo risco oncogênico mais prevalentes foram os genótipos 52 e 51. Já os de alto risco oncogênico mais prevalentes nesta mesma população foram os genótipos de HPVs 16, 52, 58 e 35. No presente estudo, no grupo de mulheres HIV-positivas, os HPVs de baixo risco oncogênico mais frequentes foram o HPV 6, 61 e 71 (cinco pacientes, cada), seguidos pelos HPV 40 e 83 (quatro mulheres, cada). Os HPVs de alto risco oncogênico mais frequentes foram o HPV 16 (13 mulheres), HPV 53 e 58 (seis mulheres cada), o HPV 18, 35 e 52 (cinco pacientes, cada), seguidos pelos HPV 33 (quatro mulheres).

O estudo de MELGAÇO ET AL (2010) investigou a prevalência e a relação de genótipos de HPV em amostras do colo do útero de 140 mulheres HIV-positivas. A prevalência global do HPV foi de 60,% e a frequência de múltiplas infecções foi de 20%. Pelo menos um genótipo de HPV encontrado nas infecções múltiplas foi de alto risco oncogênico e nenhuma infecção ocorreu com HPV de baixo risco exclusivamente. Em nosso estudo, nem todas as infecções múltiplas detectadas nas mulheres HIV-positivas apresentaram genótipos de alto risco oncogênico, sendo que 2 casos apresentaram apenas tipos de baixo risco oncogênico.

CAMPOS ET AL (2005), numa análise de 39 pacientes (30 mulheres HIV-positivas e nove mulheres HIV-negativas), constataram que a infecção múltipla predominou nas mulheres HIV-positivas (50%), enquanto nas mulheres HIV-negativas predominou a infecção simples (66,7%). Nas mulheres HIV-positivas, o genótipo 11 foi o mais frequente (13,3%), e o tipo 16 foi o genótipo mais encontrado nas mulheres não infectadas pelo HIV, sendo que entre estas pacientes não foram detectados os genótipos 6, 11, 33 e 35.

No estudo de HO ET AL (2010) o HPV foi encontrado em 44,7% das amostras HIV-negativas, e 59% das mulheres apresentaram infecções por apenas um genótipo, enquanto que 41% apresentaram infecções por múltiplos genótipos. Os principais genótipos encontrados foram: HPV 16 (26,4%), HPV 52 (26,1%) e HPV 58 (20,8%). EREN ET AL (2010) encontraram uma prevalência global de HPV de 16,5%

e múltiplos genótipos foram encontrados em 35,8% das mulheres infectadas pelo HIV. O genótipo mais prevalente nessas infecções foi o HPV 16, seguido pelos genótipos 59 e 53. A maioria das infecções múltiplas foi causada por HPVs de alto risco (18,6%), os HPVs de baixo risco oncogênico foram vistos em apenas dois casos (6,9%).

No estudo de MEJLHEDE ET AL (2009), 49% das mulheres HIV-negativas submetidas ao estudo apresentaram infecção por dois ou mais tipos de HPV, sendo que o HPV 11 foi o genótipo mais frequente nas infecções múltiplas, estando presente em apenas 4% das infecções causadas exclusivamente por um genótipo de HPV. Em nosso estudo, no grupo de mulheres que não apresentaram o vírus HIV, o HPV 16, esteve presente em apenas em uma infecção causada exclusivamente por um genótipo viral.

Na investigação de OLIVEIRA ET AL (2008), a infecção pelo HPV foi detectada em 77,2% das mulheres do estudo, sendo que, 28,5% delas apresentaram infecções múltiplas, com a maioria (98%) envolvendo dois genótipos virais. Em nosso estudo isso também ocorreu, a maioria (60%) das infecções por múltiplos genótipos nas mulheres HIV-negativas envolveram apenas dois tipos virais.

No estudo de FERENCZY ET AL (2003) verificou-se que as mulheres HIV-positivas, comparadas com as mulheres HIV-negativas, eram mais frequentemente infectadas por HPV de alto risco oncogênico, incluindo os genótipos 16 e 18. A frequência de infecções causadas por HPV de alto risco oncogênico neste trabalho foi também maior neste grupo de mulheres, perfazendo 86,6%, comparado à 70,6% nas mulheres HIV-negativas. Os genótipos mais prevalentes foram HPV 16 e 58.

Nosso trabalho mostrou que, no grupo de mulheres HIV-positivas, a frequência da infecção múltipla aumentou conforme a gravidade da lesão cervical. Nas mulheres com ASCUS a frequência foi de 6,7%, nas mulheres com LSIL essa frequência foi de 16,7% e nas mulheres com HSIL essa frequência atingiu 20%. Neste grupo, a frequência de infecção múltipla em mulheres com citologia normal foi significativa (56,6%). No entanto, no grupo de mulheres HIV-negativas, a frequência de múltiplos genótipos virais foi menor (um caso) nas mulheres com ASCUS comparado a 9 casos com citologia normal. CHANG ET AL (1997), em sua

investigação, encontrou uma maior frequência de infecção múltipla pelo HPV entre as mulheres que apresentavam lesões de baixo grau e, à medida que aumentou a gravidade da lesão cervical, a infecção simples se tornou a mais frequente.

A prevalência de múltiplas infecções sem anormalidades citológicas nas mulheres HIV-positivas deste trabalho foi de 56,6% e nas mulheres HIV-negativas essa frequência atingiu 90%. Em contra partida, no estudo de CLIFFORD ET AL (2006), a prevalência de múltiplas infecções em mulheres HIV-positivas sem anormalidade citológica foi de 11,9%, aumentando para 34,7% para aquelas com ASCUS/LSIL e 41,1% em mulheres com HSIL.

No estudo de LEVI ET AL (2002), não se encontrou uma associação significativa entre os genótipos do HPV e a classificação citológica. No presente estudo não se avaliou a associação entre os genótipos do HPV e a carga viral do HPV bem como os genótipos encontrados e a contagem de células T CD4. Porém a associação entre a presença de lesões intraepiteliais de alto grau e a detecção de múltiplos genótipos virais foi avaliada e não houve uma associação estatisticamente significativa em amostras cervicais de mulheres HIV-positivas e HIV-negativas.

NIELSSEN ET AL (2008) concluíram que o risco de adquirir múltiplos tipos de HPV de alto risco aumentou com o número de parceiros sexuais, porém no presente estudo, não houve diferença estatisticamente significativa quando essa variável foi avaliada em ambas as populações estudadas.

Os genótipos de HPV associados ao desenvolvimento do câncer do colo uterino cobertos tanto pela vacina bivalente, como pela vacina quadrivalente, são os HPVs 16 e 18. A vacina quadrivalente também confere proteção contra os genótipos 6 e 11 que estão associados às verrugas genitais (PAAVONEN ET AL, 2009). A análise da distribuição dos tipos cobertos pela vacina encontradas no presente estudo sugere que o uso dessas vacinas na amostra estudada poderia ter prevenido uma quantidade considerável das infecções, já que o genótipo 16 foi o mais prevalente em ambas as populações avaliadas. Com relação à proteção cruzada contra os genótipos 31, 33, 35, 52 e 58 (tipos relacionados ao HPV 16), e contra os genótipos 39, 45, 59, 68 e 85 (relacionados ao HPV 18) (ORTIZ ET AL, 2006) ambas as vacinas poderiam também conferir proteção contra outras

infecções ocorridas nas populações estudadas, já que os genótipos 58, 52 e 33, foram os mais prevalentes após o HPV 16.

Concluimos que é mais frequente a presença de múltiplos genótipos de HPV nas mulheres HIV-positivas do que nas mulheres HIV-negativas. Sugerimos então a necessidade de avaliar rotineiramente a presença do HPV e seus genótipos na cérvix uterina das mulheres portadoras do HIV, a fim de propor tratamentos e acompanhamentos adequados, capazes de prevenir o desenvolvimento do câncer cervical nesta população de mulheres.

CONCLUSÃO

- 1) As anormalidades citológicas cervicais foram mais comuns em pacientes HIV-positivas, incluindo as anormalidades de significado indeterminado, as lesões de baixo grau e as lesões de alto grau, comparadas às mulheres HIV-negativas;
- 2) O genoma do HPV foi mais prevalente em amostras cervicais de mulheres HIV-positivas, sugerindo que a infecção pelo HIV representa um importante fator de risco para a infecção pelo vírus HPV.
- 3) As infecções por múltiplos genótipos de HPV foram mais prevalentes no grupo de mulheres HIV-positivas comparadas às mulheres HIV-negativas.
- 4) No grupo de mulheres HIV-positivas foram detectados 104 genótipos virais, sendo os principais genótipos encontrados os HPV 16, 58, 52 e o 33. Já no grupo de mulheres HIV-negativas, foram detectados 34 genótipos virais, sendo os principais genótipos os HPV 16, 52, 66, 55 e 18.
- 5) Nosso estudo, não detectou uma associação estatisticamente significativa entre a presença de anormalidades citológicas e a detecção de múltiplos genótipos virais, em amostras cervicais de mulheres HIV-positivas e HIV- negativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERG, J. A. ET AL. Primary care guidelines for the management of persons infected with human immunodeficiency virus: recommendations of the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, n.39, p. 609 - 629, 2004.

AHDIEH, L. ET AL. Prevalence, incidence, and type-specific persistence of human papillomavirus in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative women. **Journal Infectious Diseases**, n.184: p. 682 - 690, 2001.

ASATO, T. ET AL. A large case-control study of cervical cancer risk associated with human papillomavirus infection in Japan, by nucleotide sequencing based genotyping. **The Journal of Infectious Disease**, v. 189, p. 1829-1832, 2004.

AULT, K. A. Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections in the Female Genital Tract. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, p.1-5, 2006.

BANURA, C. ET AL. Infection with human papillomavirus and HIV among young women in Kampala, Uganda. **Journal Infectious Diseases**, 197, p. 555–562, 2008.

BASEMAN, G. J.; KOUSTLY, L. A. The epidemiology of human papillomavirus infections. **Journal of Clinical Virology**. 32S, p. S16 – S17, 2005.

B EGLIN, M.; MELAR-NEW M.; LAIMINS, L. Human papillomaviruses and the interferon response. **Journal of Interferon Cytokine Research**, 29 (9): p. 629-35, Review, Sep, 2009.

DAL BELLO, B. D. ET AL. Cervical infections by multiple human papillomavirus (HPV) genotypes: Prevalence and impact on the risk of precancerous epithelial lesions. **Journal of Medical Virology**. 81(4): p. 703-12, Apr, 2009.

BERNARD, H-U, ET AL. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, 401(1), p. 70-79, May, 2010.

BEZERRA, S. J. S. ET AL. Perfil de mulheres portadoras de lesões cervicais por HPV quanto aos fatores de risco para câncer de colo uterino. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 17, n. 2, p. 143-148, 2005.

BOSCH, F. X. ET AL. The causal relation between human papillomavirus and cancer cervical. **Journal of Clinical Pathology**, 55: p. 244-265, 2002.

BOSCH, F. X.; DE SANJOSÉ, S. Human papillomavirus humano and cervical cancer-burden and assessment of causality. **Monographs Journal National Cancer Institute**, 31, p.3-13, 2003.

BOSCH, F. X. ET AL. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. **Journal National. Cancer Institute**, 87, p. 796-802, 1995.

BRINK, A. A. T. P. ET AL Clinical relevance of human papillomavirus testing in cytopathology. **Cytopathology**. 16, p. 7-12, 2005.

BURD E.M. Human Papillomavirus and Cervical Câncer. **Clinical Microbiology Reviews**, 16 (1): p. 1-17, 2003.

BURK, R. D. ET AL. Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. **Sexually Transmitted Diseases**, 23: 333-41, 1996.

CAMPOS, R. R.; MELO, V. H.; CASTILHO, D. M. Prevalence of human papillomavirus and its genotypes in the uterine cervix of HIV-infected and non-infected women. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, 27(5): p. 248-56, 2005.

CAPRA, G. ET AL. HPV genotype prevalence in cytologically abnormal cervical samples from women living in south Italy. **Virus Research**, 113, p. 195–200, 2008.

CARESTIATO, F. N. ET AL. Analysis of molecular biology techniques for the diagnosis of human papillomavirus infection and cervical cancer prevention. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 428-432, 2006.

CARVALHO, M. O. O. ET AL. Human Papillomavirus Infection in Rio de Janeiro, Brazil: a Retrospective Study. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, p.398-404, October, 2005.

CARVALHO, N. O. ET AL. Comparison of HPV genotyping by type –specific PCR and sequencing. **Memórias do Instituto do Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105(1), p. 73-78, February. 2010.

CASTELLSAGUE, X.; MUNOZ, N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis: role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. **Journal of the National Cancer Institute Monographs** 31, p. 20-28, 2003.

CASTELLSAGUE, X. ET AL. Prevalence of penile human papillomavirus DNA in husbands of women with and without cervical neoplasia: a study in Spain and Colombia. **Journal Infectious Diseases**, 176, p. 353-61, 1997.

CASTLE, P. E. ET AL. Comparisons of HPV DNA detection by MY09/11 PCR methods. **Journal of Medical Virology**, v. 68, p. 417-423, 2002.

CAVALCANTI S. M. B.; CARESTIATO F. N. Infecções causadas pelos Papilomavírus humanos: Atualização sobre aspectos Viroológicos, Epidemiológico e Diagnóstico. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, 18 (1): p. 73-79, 2006.

CERQUEIRA D. M. ET AL. New variants of human papillomavirus type 18 identified in central Brazil. **Virus Genes**, 37: p. 282-287, 2008.

CERQUEIRA, D. M. ET AL. Caracterização molecular do papilomavirus humano em mulheres infectadas com o vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 no Distrito Federal e Entorno. **Comunicação em Ciências da Saúde**, v. 18, n. 4, p. 267-278, 2007.

CHAN, P. K. S. ET AL. Biases in human papillomavirus genotype prevalence assessment associated with commonly used consensus primers. **International Journal of Cancer**, v.118, p. 243-245, 2006.

CHANG D.Y. Et AL. Prevalence of single and multiple infection with human papillomaviruses in various grades of cervical neoplasia. **Journal of Medical Microbiology**, 46(1): p. 54-60, 1997.

CHANG, Y. ET AL. Evaluating the impact of human papillomavirus vaccines. **Vaccine**, 27: p. 4355-4362, 2009.

CHATURVED, I A. K. ET AL. Prevalence and clustering patterns of human papillomavirus genotypes in multiple infections. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, 14; p.2439–2445, 2005.

CLIFFORD, G. M. ET AL. 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: p. 991–8, 2005.

CLIFFORD, G. M. ET AL. Human papillomavirus types among women infected with HIV: a meta-analysis. **AIDS**. 28; 20 (18):p. 2337-44, Nov. 2006.

CLIFFORD, G. M. ET AL. Human papillomavirus types in invasive cancer worldwide a meta-analysis. **British Journal of Cancer**. 88: p. 63-73, 2003.

COELHO, F. F. R. C. ET AL. Estrogen and progesterone receptors in human papilloma vírus- related cervical neoplasia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 37: p. 83-88, 2004.

COUPLÉE, F. ET AL. Use of PGM1 primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 902-907, Mar. 2002.

COUPLÉE, F. ET AL. The laboratory diagnosis of genital human papillomavirus infections. **Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**, v. 16, n. 2 Mar/Apr 2005.

COX, J. T. The development of cervical cancer and its precursors: what is the role of human papillomavirus infection? **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, 18 Suppl. 1, p. s5-s13, 2006.

COX, T.; CUZICK J. HPV DNA testing in cervical cancer screening: From evidence to policies. **Gynecologic Oncology**, v.103, p. 8-11, 2006.

CUSCHIERI, K. S. ET AL. Multiple high-risk infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. **Journal of Clinical Pathology**, 57: p. 68-72, 2004.

CUSCHIERI, K. S. ET AL. Persistent high risk HPV infection associated with development of cervical neoplasia in a prospective population study. **Journal of Clinical Pathology**, 58: p. 946-950, 2005.

DE JONG, A. ET AL. Frequent detection of human papillomavirus 16 E2-specific T-helper immunity in healthy subjects. **Cancer Research**, 62: p. 472-479, 2002.

DE LEON, S. S. ET AL. Distribution Patterns of Infection with Multiple Types of Human Papillomaviruses and Their Association with Risk Factors. **PLoS One**. 6(2):e14705, 2011 Feb 17.

DE RODA, HUSMAN, A M. ET AL. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 1057-1062, 1995.

DE SANJOSE, ET AL. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. **Lancet Infectious Diseases**. 7p. 453–459, 2007.

DE VILLIERS, ET AL. Classification of papillomaviruses. **Virology**; v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004.

DE VILLIERS, E. M. Papillomavirus and HPV typing. **Clinics in Dermatology**, v. 15, p. 199- 206, 1997.

DE VUYST, H, ET A. L. Human papillomavirus types in women with invasive cervical carcinoma by HIV status in Kenya. **International Journal of Cancer**, 122: p. 244–246, 2008.

DEHN, D.; TORKKO K. C; SHROYER K. R. Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. **Cancer**, 111(1):p. 1-14, February. 25, 2007.

DERCHAIN, S.; ET AL. Infection by the human papillomavirus in teenagers sexually active: clinic and subclinic manifestations. **São Paulo Medical Journal**, vol.113, n.4, p. 948-952, 1995

EREN F., ET AL Prevalence of HPV infection by cytologic diagnosis and HPV DNA extraction and prevalence of the genotypes detected in urban Turkish women. **International Journal of. Gynecology & Obstetrics**. 109(3):235-8. Jun, 2010.

DOOBAR, J. The papillomavirus life cycle. **Journal Clinical Virology**, 32, S1: S7-S15, 2005.

DOOPRBAR, J; STERLING, J. C. The biology of human papillomaviruses In: Sterling JC and Tying SK, editors. Human papillomaviruses - Clinical and scientific advances. **Arnold**, 2: p. 10-23, 2001.

ENGELS, E. A. ET AL. Trends in cancer risk among people with AIDS in the United States 1980–2002. **AIDS**, 20: p. 1645–1654, 2006.

FARIDI, R, ET AL. Oncogenic potential of human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical câncer. **Virology Journal** 8: 269, Disponível em: <<http://www.virologyj.com/content/8/1/269>>. Acesso em: jul. 2011.

FEHRMANN, F.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. **Oncogene**, 22(33): p. 5201–5207, 2003.

FERENCZY, A.; ET AL. Human papillomavirus and HIV coinfection and the risk of neoplasias of the lower genital tract: a review of recent developments. **CMAJ**, 169 (5): p. 431-4, 2003.

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

FRANCO, E. L.; DUARTE-FRANCO, E.; FERENCZY A. Cervical câncer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. **CMAJ**, 164 (7):p. 1017-1025, 2001.

FRANCO, E. L. Cancer causes revisited: human papillomavirus and cervical neoplasia. **Journal National Cancer Institute**, 87(11): p. 779-780, 1995.

FRAZER, H. I. ET AL. Advances in prevention of cervical cancer and others human papillomavirus-related diseases. **Pediatric Infectious Diseases**. 25: p.S65-S81, 2006.

FREITAS, T. P. ET AL. Molecular detection of HPV 16 and 18 in cervical samples of patients from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 5, p. 297-301, 2007.

FUJINAGA, Y. ET AL. Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus DNA using the polymerase chain reaction. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 1039-1044, 1991.

GALANI, E. & CHRISTODOULOU, C. Human papilloam viruses and cancer in the post- vaccine era. European Society of Clinical Microbiology an Infectious Diseases, **CMI**, 15, 977-981, 2009.

PALEFSKY ET AL. Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. **Journal. National Cancer Institute**. 91, p. 226–236, 1999.

GARCIA-CHACON R. ET AL. Immunobiology of HPV Infection. **Archives of Medical Research**, 40, 443 e 448, 2009.

GARGIULO, F. ET AL. Prevalence and distribution of single and multiple HPV infections in cytologically abnormal cervical samples from Italian women. **Virus Research**. 125 (2):p. 176-182, 2007.

GHITTONI, R. ET AL. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. **Virus Genes**, 40(1):p. 1-13, February, 2010.

GIARRÈ, M. ET AL. Induction of pPRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16 INK4a: imposed G1 cell cycle arrest. **Journal Virology**, v. 75, p. 4705-12, 2001.

GIULIAN, A. R. ET AL Clearance of oncogenic human papillomavirus (HPV) infection: effect of smoking (United States). **Cancer Causes Control**, 13: p. 839–46, 2002.

GNANAMONY, M.; PEEDICAYIL, A.; ABRAHAM, P. An overview of human papillomaviruses and current vaccine strategies. **Indian Journal of Medical Microbiology**, 25 (1): p. 10-7, 2007.

GRAVITT, P. E.; MANOS M. M. **Polymerase chain reaction-based methods for the detection of human papillomavirus DNA**. International Agency for Research on Cancer 119: p. 121-133, 1992.

GRAVITTI, P. E. ET AL Improved Amplification of genital human papillomaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 357-361, 2000.

GREEN, J. ET AL Risk factors for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix in women aged 20–44 years: The UK National Case-Control Study Cervical Cancer. **British Journal Cancer**. 89 (11): p.2078–2086, 2003.

GREGOIRE, L. ET AL Amplification of human papillomavirus DNA sequences by using conserved primers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 12, p. 2660-2665, 1989.

GUGLIELMO, Z.; RODRÍGUEZ. A Métodos utilizados en la identificación del virus de papiloma humano Methods used in the identification of human papillomavirus n. **An Sist. Sanit. Navar**, v. 33, n. 1, p 71-77, enero-abr. 2010.

HAGENSEE, M. E. ET AL. Human papillomavirus infection and disease in HIV-infected individuals. **American Journal of the Medical Sciences**, 328 (1): p. 57–63, 2004.

HARPER, D. M.; WILLIAMS, K. B. Prophylactic HPV vaccines: current knowledge of impact on gynecologic premalignancies. **Discovery Medicine**. (50): p.7-17, July, 2010.

HARRO, C.D. ET AL. Safety and Immunogenicity Trial in Adult Volunteers of a Human Papillomavirus 16 L1 Virus-Like Particle Vaccine. **Journal National Cancer Institute**, 93: p. 284-292, 2001.

HENDE M Van Den, ET AL. Skin reactions to human papillomavirus (HPV) 16 specific antigens intradermally injected in healthy subjects and patients with cervical neoplasia. **Intitute Journal Cancer**, 123: p. 146-152, 2008.

HILDESHEIM, A.; WANG, S. S. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. **Virus Research**, 89: p. 229-40, 2002.

HIPPELÄINEN, M. ET AL. Prevalence and Risk Factors of Genital Human Papillomavirus (HPV) Infections in Healthy Males: A Study on Finnish Conscripts. **Sexually Transmitted Diseases**, 20: 321-8, 1993.

HO, C. M. ET AL. Type-specific human papillomavirus oncogene messenger RNA levels correlate with the severity of cervical neoplasia. **International Journal of Cancer**. 1;127 (3): p. 622-32, August. 2010.

HO, G. Y. ET AL. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. **Journal National Cancer Institute** p. 1365-1371, 1995.

HOORY, T. ET AL. Molecular Epidemiology of Human Papillomavirus. **Journal of the Formosan Medical Association**, 107 (3), p. 198-217, 2008.

HUSNJAK, K. ET AL. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. **Journal of Virological Methods**, v. 88, p. 125-134, 2000.

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

INCA. Instituto Nacional do Câncer Coordenação e Vigilância. **ESTIMATIVA DA INCIDÊNCIA E MORTALIDADE POR CÂNCER NO BRASIL**, Rio de Janeiro: INCA; 2010: Disponível em <<http://www.inca.gov.br/>> Acesso em: 10 abril 2010.

FIFE, K. H. ET AL. Detection of multiple human papillomavirus types in the lower genital tract correlates with cervical dysplasia. **Journal of Medical Virology**. 64 (4):550-9, August, 2001.

JACOBS, M. V. ET AL. Reliable high risk HPV DNA testing by polymerase chain reaction: an intermethod and intramethod comparison. **Journal of Clinical Pathology**, v.52, p. 498-503, 1999.

JAYSHREE, R. S. ET AL. Cell intrinsic & extrinsic factors in cervical carcinogenesis. **Indian Journal of Medical Research**. 130, p. 286-295, September, 2009.

KAPEU, A. S. ET AL. Is Smoking an Independent Risk Factor for Invasive Cervical Cancer? A Nested Case-Control Study Within Nordic Biobanks. **American Journal of Epidemiology**, 169:p. 480–488, 2009.

KADO, S. ET AL. Detection of human papillomavirus in cervical neoplasias using multiple sets of generic polymerase chain reaction primers. **Gynecologic Oncology**, v. 81, p. 47-52, 2001.

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

KENTER G. ET AL. Effective treatment of vulvar intraepithelial neoplasia by vaccination against the oncoproteins E6 and E7 of human papillomavirus type 16. **New England Journal of Medicine**, 361:1838-1847, 2009.

KJAER, S.K. ET AL. Acquisition and persistence of human papillomavirus infection in younger men: a prospective follow-up study among Danish soldiers. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention**, 14:1528–33, 2005.

KLETER, B. ET AL. Novel short-fragment PCR assay for high sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. **American Journal of Pathology**, v. 153, n.6, p. 1731-1739, 1998.

KOSHIOL J. E. ET AL. Time to clearance of human papillomavirus infection by type and human immunodeficiency virus serostatus. **International Journal of Cancer**, 119:1623–1629, 2006.

KOUTSKY L. Epidemiology of genital human papillomavirus. **American Journal of Medicine**. 5;102 (5A):3-8, May, 1997.

LAJOUS M. ET AL. Determinants of prevalence, acquisition, and persistence of human papillomavirus in healthy Mexican military men. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention**;14:1710 - 6, 2005.

LANSELINK C.H. ET AL. Sexual Behaviour and HPV infections in 18 to 29 year old women in the Pre- Vaccine Era in the Netherlands. **Plos One** 3 (11): e 3743, 2008.

LAU, S. & FRANCO, E.L. Management of low – grade cervical lesions in young women. **Canadian Medical Association Journal** . v. 173, n. 7. 771-774, september. 27, 2005.

LEE S.H. ET AL. Routine human papillomavirus genotyping by DNA sequencing in community hospital laboratories. **Infectious Agents and Cancer** 2: 1-11, 2007.

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

LETO, M. G. P., ET AL. Human papillomavirus infection: ethiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 86 (2):306-17, 2011.

LEVI, J. E.; ET AL. Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. **Gynecologic Oncology**, 92: 225–231, 2004.

LEVI, J. E. ET AL. High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, 3341-5, 2002.

LIZANO, M.; BERUMEN, J.; CARRANCÁ-GARCÍA A. HPV related Carcinogenesis: Basic Concepts, Viral Types and Variants. **Archives of Medical Research** 20, 428-434, 2009.

MACIAG, P. C.; VILLA, L. L. Genetic susceptibility to HPV infection and cervical cancer. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 32: 915-922, 1999.

MAGGINO, T. ET AL. Impact of an HPV diagnosis on the quality of life in young women. **Gynecologic Oncology**, v. 107, Issue 1, Supplement 1, p. S175-S179, October, 2007.

MAHDAVI, A.; MONK, B. J. Vaccines against human papillomavirus and cervical cancer: promises and challenges. **Oncologist** v.10, n.7, p.528-38, August, 2005.
MANOS, M. M. ET AL. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Cancer Cells**, v. 7, p.209-214, 1989.

MAO, C.; ET AL. Clinical findings among young women with genital human papillomavirus infection. **American Journal of Obstetrics and Gynecology.**, 188(3): 677-684, 2003.

MEJLHEDE, N.; BONDE, J.; FOMSGAARD, A. High frequency of multiple HPV types in cervical specimens from Danish women. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, 117:108–14, 2009.

MEJLHEDE, N.; ET AL. Multiple human papilloma virus types in cervical infections: competition or synergy? **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, 118: 346–352, May 2010.

MELGAÇO, F. G. ET AL. Human papillomavirus genotypes distribution in cervical samples from women living with human immunodeficiency virus. **Medicine Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 283, n. 4, 2010.

MENDEZ, F. ET AL. Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types and possible implications for the prevention of cervical cancer by HPV vaccines. **Journal of Infectious Diseases**, 192: 1158-1165, 2005.

MENZO, S. ET AL. Molecular epidemiology and pathogenic potential of underdiagnosed human papillomavirus types. **BMC Microbiology** 8: 112:1-7, 2008.

MOLIJIN A, ET AL. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. **Journal of Clinical Virology**. 32S: S43-S51, 2005.

MONTALDO, C. ET AL. Detection and genotyping of human papillomavirus DNA in samples from healthy Sardinian patients: a preliminary study. **Journal of Oral Pathology & Medicine** 36: 482-487, 2007.

MORENO, V. ET AL. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case–control study. **Lancet** , 359:1085–92, 2002.

MOSCIEKI A. B. Impact of HPV infection in adolescent populations. **Journal Adolescent Health** 37:6, S3-S9, 2005.

MOYA, A. S. ET AL. Detección y tipificación mediante biología molecular del virus del papiloma humano en muestras genitales. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 19, n. 2, p. 161-166, 2006.

MUNGER, K. ET AL. Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. **Journal of Virology**, p. 11451-11460, v. 78, n. 21, November, 2004.

MUNOZ, N.; ET AL. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **New England Journal of Medicine**, 348: 518–527, 2003.

MUNOZ, N. ET AL. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24, n. 3, p. 3-10, 2006.

MUNOZ, N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. **Journal of Clinical Virology**, v. 19, p. 1-5, 2000.

NADAL, S. R.; MANZIONE, C.R. Vacinas contra o Papilomavirus Humano. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, 26 (3): 337-340, 2006.

NICOL, A. F.; FERNANDES, A. T.; BONECINI-ALMEIDA M. D. A. G. Immune response in cervical dysplasia induced by human papillomavirus: the influence of human immunodeficiency virus-1 co-infection-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 100:1–12, 2005.

NIELSEN, A. ET AL. Type-specific HPV infection and multiple HPV types: prevalence and risk factor profile in nearly 12,000 younger and older Danish women. **Sexually Transmitted Diseases**. 35 (3):276-82, March, 2008.

OLIVEIRA, L. H. S.; ROSA, M. L. G., CAVALCANTI, S. M. B. Patterns of genotype distribution in multiple human papillomavirus. **Clinical Microbiology and Infection**. 14 (1),

OLIVEIRA-SILVA ET AL. Human Papillomavirus in Brazilian women with and without cervical lesions. **Virology Journal**, 8:4, 2011.

ORTIZ, M. ET AL. Oncogenic human papillomavirus (HPV) type distribution and HPV type 16E6 variants in two Spanish population groups with different levels of HPV infection risk. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1428-1434, 2006.

OSTER, A. M.; SULLIVAN, P. S.; BLAIR, J. M. Prevalence of Cervical Cancer Screening of HIV-Infected Women in the United States. **Journal Acquired Immune Deficiency Syndromes** v. 51, n. 4, August 1, 2009.

PAAVONEN, J. ET AL. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types : final analysis of a double-blind, randomised study in young women. **Lancet** 374: p. 301-314, 2009.

PALEFSKY, J. M. Cervical human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia in women positive for human immunodeficiency virus in the era of highly active antiretroviral therapy. **Current Opinion in Oncology**, 15:382-38, 2003.

PALEFSKY, J. M.; ET AL. Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. **Journal of the National Cancer Institute**; 91: p. 226-36, 1999.

PARKIN, D. M.; BRAY, F. Chapter: The burden of HPV- related cancers. **Vaccine**; 24 Suppl 3: S3. P. 11-25, August, 31, 2006.

PERRONS, C. ET AL. Detection and genotyping of human papillomavirus DNA by SPF10 and MY09/11 primers in cervical cells taken from women attending a colposcopy clinic. **Journal of Medical Virology**. 67(2):246-52, June, 2002.

PINTO, A. P.; TULIO, S.; CRUZ, O. R. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical. **Revista da Associação Médica Brasileira**. São Paulo, 48(1): 73-8, 2002.

PINTO, A. P. ET AL. HPV-16 L1 VLP vaccine elicits a broad-spectrum of cytokine responses in whole blood. **Vaccine**, 23 27: p. 3555-3564, May, 2005.

PLUMMER M.; ET AL. Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case-control study. **Cancer Causes and Control**. 14(9): p. 805-814, 2003.

PLUMMER M. ET AL. A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. **Journal of Infectious Diseases**;195:1582–9, 2007.

POPPE, W. A. ET AL. Tobacco smoking impairs the local immunosurveillance in the uterine cervix. An immunohistochemical study. **Gynecologic and Obstetric Investigation**; 39: p. 34–8, 1995.

QUEIROZ, C. M. P.V. HPV: Epidemiologia e oncogênese. **Curso de Atualização dos Aspectos e Prognósticos em lesões induzidas pelo HPV no Colo Uterino e na Co-infecção HPV-AIDS**, p. 11-15, 2007:

REMMEPRBACH, T. W. ET AL. PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. **Journal of Clinical Virology**, 30: p. 302-308, 2004.

RICHART, R. M.; ET AL. Human Papillomavirus. **Acta Cytologia**, 42: p. 50-58, 1998.

RIVOIRE, W. A.; ET AL. Biologia do cancer cervical. **Revista Brasileira Saúde Materna Infantil**, Recife, 6(4): out/dez, p. 447-451, 2006.

RODRIGUES A., D.; ET AL. Comparação das técnicas de captura de híbridos e PCR para a detecção de HPV em amostras clínicas. **Jornal Brasileiro Patologia e Medicina Laboratorial** v. 45 n. 6 p. 457-462, dezembro, 2009.

RODRIGUEZ, A.C. ET AL. Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. **Journal of the National Cancer Institute** 100: p. 513–517, 2008.

RONCO, G. ET AL. Prevalence of human papillomavirus infection in women in Turin, Italy. **European Journal of Cancer Prevention**. 41(2): p. 297-305, Jan, 2005.

ROUSSEAU, M. C. ET AL. Occurrence of cervical infection with multiple human papillomavirus types is associated with age and cytologic abnormalities. **Sexually Transmitted Diseases**, 30: p. 581–587, 2003b.

SAIKI, R. K. ET AL. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, n.4839, p. 487-491, 1988.

SANCLEMENTE, G.; GILL, D. K. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. **Journal of European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 16, p. 231-240, 2002.

SASAGAWA, T. ET AL. A new PCR-based assay amplifies the E6-E7 genes of most mucosal human papillomavirus (HPV). **Virus Research**, v. 67, p. 127-139, 2000.

SASAGAWA, T. ET AL. High-risk and multiple human papillomavirus infections associated with cervical abnormalities in japanese women. **Cancer Epidemiology, Biomarker & Prevention**, v. 10, p. 45-52, 2001.

SCHIFFMAN, M.; CASTLE, P. E. Human Papillomavirus: Epidemiology and Public Health. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 127, p. 930-934, 2003.

SCHOCHETMAN G, OU C-Y, JONES WK .Polymerase Chain Reaction. **Journal Infectious Diseases**,158: p. 1154-1157, 1988.

SCHUMAN, P.; ET AL. Longitudinal study of cervical squamous intraepithelial lesions in human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and at-risk HIV-seronegative women. **Journal Infectious Diseases**. 188: p. 128–136, 2003.

SEHGAL, A & SINGH, V. Human papillomavirus infection (HPV) & screening strategies for cervical cancer. **Indian Journal of Medical Research** 130, p. 234-240, Sep. 2009.

SELLORS J. W. ET AL. Incidence, clearance and predictors of human papillomavirus infection in women. **JAMC** 168(4):168-74, 2003.

SILVA, A. M. T. C.; AMARAL, M. V. T.; CRUZ, A. D. da. **HPV e câncer. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** (29), 2003.

SILVA, K. C. ET AL. **Risk** factors associated with human papillomavirus infection in two populations from Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol (104(6): p. 885-891, September. 2009.

SNIJDERS, P. J. F.; HEIDEMAN, D. A. M.; MEIJER, C. J. L. M.. Methods for HPV detection in exfoliated cell and tissue specimens. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica** 118: p. 520-528, 2010.

SNIJDERS, P. J. F. ET AL. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. **Journal of General Virology**, v. 71, p. 173-181, 1990.

SOLOMON, D.; NAYAR, R. **The Bethesda System for Reporting Cervical**. Springer Verlag Edit, 2th ed.

SOTLAR, K. Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 42, p. 3176-3184, 2004.

SOUTO R.; FALHARI J.P.B.; DA CRUZ, A.D. O Papilomavirus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia** 51(2): p. 155-160, 2005.

SOUZA, N. S. T.; MELO, V. H.; CASTRO, L. P. F. Diagnóstico da infecção pelo HPV em lesões do colo do útero em mulheres HIV+: Acuidade da histopatologia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 23, n. 6, p. 355-361, 2001.

STANLEY, M. A. Immunobiology of papillomavirus infections. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 52, p.45-59, 2001.

STEBEN M, DUARTE-FRANCO E. Human papillomavirus infection: Epidemiology and pathophysiology. **Gynecologic Oncology** Volume 107, Issue 2, Supplement 1, p. S2-S5 , nov. 2007.

STOREY A. ET AL. **Role of p53 polymorphism in the development of human papillomavirus- associated cancer**. *Nature*, v. 393, p. 229-234, 1998.

STRICKLER H. D. ET AL. Natural History and possible reactivation of human papillomavirus in human immunodeficiency virus- positive women. **Journal of the National Cancer Institute**, 97 (8): p. 577-586, 2005.

STRICKLER H.D. ET AL. Human papillomavirus type 16 and immune status in human immunodeficiency virus-seropositive women. **Journal of the National Cancer Institute**, 95: p.1062–1071, 2003.

STUBENRAUCH, F.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. **Cancer Biology**, v. 9, p. 379-386, 1999.

SZOSTEK, S. ET AL. Detection of human papillomavirus in cervical cell specimens by hybrid capture and PCR with different primers. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, n. 3, p. 603-607, 2006.

TANZI E. ET AL. Human papillomavirus genotypes and phylogenetic analysis of HPV-16 variants in HIV-1 infected subjects in Italy. **Vaccine**. 29;27 Suppl 1:A17-23, May, 2009.

THOMAS M.; PIM D.; BANKS L. The role of the E6- p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. **Oncogene** 18, p. 7690-7700, 1999.

THOMISSON III, J.; THOMAS, L. K.; SHROYER, K. R. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. **Human Pathology**, v. 39, p. 154-166, 2008.

TOLEDO, C. P.; SEIXAS, F. A.V. Formas de tratamento de infecção por HPV no trato genital feminino. **Arq. Ciências Saúde Unipar** 9 (3):, p. 189-197, set. – dez. 2005.

TROTTIER, H. ET AL. Type-specific duration of human papillomavirus infection: Implications for human papillomavirus screening and vaccination. **Journal Infectious Diseases** 197: p. 1436–1447, 2008.

TROTTIER, H, ET AL. Human Papillomavirus Infections with Multiple Types and Risk of Cervical Neoplasia. **Cancer Epidemiologic Biomarkers Prevention** 15(7) 1274-1280, July 2006.

VAN DER BURG, S. H.; PALEFSKY, J. M. Reviews: Human immunodeficiency virus and humanpapilloma virus – why HPV-induced lesions do not spontaneously resolve and why therapeutic vaccination can be successful. **Journal of Translational Medicine**, p. 7:108, 2009.

VAZ L. P. ET AL. Epidemiologia da infecção pelo HPV em mulheres infectadas pelo HIV. **FEMINA** vol 39 nº 1, p 35-40, Janeiro 2011.

VERTERAMO, R. ET AL. Direct sequencing of HPV DNA detected in gynaecologic outpatients in Rome, Italy. **Microbes Infect Journal** 8: p. 2517-2521, 2006.

VETRANO G, ET AL. Cervical intraepithelial neoplasia: risk factors for persistence and recurrence in adolescents. **European Journal of Gynaecological Oncology** 22 (3) p. 189-192, 2007.

VIDELA S. ET AL. Epidemiological Data of Different Human Papillomavirus Genotypes in Cervical Specimens of HIV-1–Infected Women Without History of Cervical Pathology. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**. Volume 50, Number 2, February 1, 2009

VILLA, L. L. Aspectos moleculares da oncogênese por papillomavirus. In: BIBBO M. ; SILVA F. A. Z. Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital. Rio de Janeiro: **Revinter**; p. 51-58, 1998.

VILLA L. L. Vacines against papillomavirus infection and disease. **Salud Publica de Mexico**; 45 Suppl3: p. 443-8, 2003.

VILLA, L. L. ET AL. An approach to human papillomavirus identification using low stringency single specific primer PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 9, p. 45-48, 1995.

VILLA, L. L. Human papillomaviruses and cervical cancer. **Advances in Cancer Research**. 71: p. 321-341, 1997.

WALBOOMERS, ET AL. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **Journal of Pathology**, v. 189, n. 1, p. 12-9, 1999.

WINKELSTEIN W. Smoking and cancer cervical of the uterine cervix: hypothesis. **American Journal of Epidemiologic**. 106: 257, 1997.

WOODMAN, C.B., COLLINS, S.I., YOUNG, L.S.. **The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues**. *Nat Rev Cancer* 7(1): p. 11-22, 2007.

YAMAGUCHI, A. ET AL. Detection of human papillomavirus DNA by PCR/microfluometry for screening of cervical cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 318, p. 41-49, 2002.

ZAJAC, A. J., ET AL. Therapeutic vaccination against chronic viral infection: the importance of cooperation between CD4+ and CD8+ T cells. **Current Opinion of Immunology** 10: p. 444-449, 1998.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses – to vaccination and Beyond. **Biochemistry**. (Moscow), v. 73, n. 5. p. 498-503, 2008.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer** 2: p. 342-50, 2002.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92. n. 9, May 3, 2000.

ANEXO 1- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Universidade Católica de Goiás –
Pró-Reitoria de Pós Graduação e Pesquisa Departamento de Biologia –
Mestrado em Genética**

Projeto: DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV) EM MULHERES HIV-POSITIVAS E EM CONTROLES DE GOIÂNIA-GO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Você está sendo convidada para participar, como voluntária, em uma pesquisa. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizada de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Detecção e Genotipagem do papilomavírus humano (HPV em mulheres soropositivas para o vírus da imunodeficiência humana, em Goiânia-GO.

Pesquisador Responsável:

Vera Aparecida Saddi (CPF:17009006172)

Pesquisadores participantes:

Luciana Pinheiro Vaz (CPF: 776530091-15)

Fernanda Cristina de Lima (CPF: 003356891-08)

Silvia Helena Rabelo (CPF: 375166551-04)

Rosane Ribeiro F. Alves (CPF: 288378516-34)

Michelle Christine Carlos Rodrigues (CPF: 708687941-04)

Descrição da pesquisa, objetivos, procedimentos, forma de acompanhamento:

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus DNA transmitido sexualmente, sendo aceito como o agente etiológico central na gênese de tumores cervicais, pois

mais de 90% desse tipo de câncer apresenta DNA do HPV (Palefsky ET AL, 2003). As infecções por HPV estão associadas com lesões cutâneas e do epitélio mucoso. Mais de 100 tipos diferentes de HPVs já foram identificados, dos quais 40 tipos foram detectados em carcinomas cervicais e suas lesões precursoras, as denominadas lesões intraepiteliais escamosas (SIL) (Levi ET AL, 2002), comumente classificadas como lesões de baixo risco (LSIL) e lesões de alto risco (HSIL).

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) tem sido associada a uma alta prevalência de HPV, com uma maior incidência de SIL e aumento do risco de câncer cervical em mulheres HIV-positivas (Palefsky ET AL, 1999; Weissenborn ET AL, 2003).

O presente estudo pretende detectar o DNA do HPV e os possíveis genótipos, em amostras cervicais, através da técnica de PCR, em mulheres HIV-positivas e mulheres HIV-negativas na cidade de Goiânia –GO.

Objetivo: Comparar a prevalência das infecções pelo HPV e seus possíveis fatores de risco entre mulheres HIV-positivas e HIV-negativas, na cidade de Goiânia-GO.

Metodologia: As mulheres HIV-positivas serão submetidas semestralmente à contagem de células linfocitárias do tipo CD4 e CD8, pelo método de citometria de fluxo e avaliação da carga viral, pelo método NASBA, como parte da rotina assistencial. Após concordarem em participar do projeto, as pacientes deverão assinar o termo de consentimento livre e esclarecido e responder um questionário. As mulheres que atenderem ao convite serão incluídas no estudo e submetidas à coleta de material cérvico-vaginal para exame citológico e molecular.

No Laboratório da Área da Saúde (LAS) da Universidade Católica de Goiás e no CADA, em Goiânia, as mulheres soronegativas e as soropositivas para o HIV, respectivamente, serão submetidas ao exame clínico cuidadoso, com inspeção dos genitais externos e da região perianal. A seguir, com uma espátula de Ayre será coletado material de fundo de saco vaginal e da ectocérvice. Utilizando uma escova de *cytobrush*, com um diâmetro 5 a 8 mm, será coletado material da endocérvice (com seis movimentos rotatórios) para exame citopatológico, realizado pelo método

convencional e detecção de HPV. Após a confecção das lâminas, as escovas serão mergulhadas em uma solução-tampão preservadora (UCM– Roche) para posterior pesquisa de DNA de HPV e genotipagem, pelo método de PCR. Quando indicados, exames colposcópicos com ácido acético a 3% e biópsia do colo do útero poderão ser realizados. Após o diagnóstico, as pacientes poderão ser atendidas no ambulatório de ginecologia da Santa Casa de Misericórdia ou do Hospital de Doenças Tropicais, com seguimento apropriado e/ou tratamento.

A paciente que voluntariamente concordar em participar do projeto e assinar o termo de consentimento será, submetida a uma coleta de material cervical, realizada por uma médica ginecologista habilitada. Assim, tal procedimento não deverá oferecer nenhum risco à paciente.

Os dados pessoais de cada paciente serão mantidos em absoluto sigilo. Os resultados obtidos serão utilizados somente para fins científicos, podendo ser publicados em revistas e jornais especializados.

A paciente tem garantia expressa de liberdade para retirar o consentimento escrito e se desligar da pesquisa em qualquer fase que julgar necessária.

Vera Aparecida Saddi e/ou Luciana Pinheiro Vaz

Eu, _____
, RG/ CPF/ N° de prontuário/ N° de matrícula _____,
abaixo assinado, concordo em participar do estudo como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento.

Local e data _____

Nome e Assinatura do sujeito ou responsável : _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunha (não ligada à equipe de pesquisadores):

Nome: _____ Assinatura: _____

ANEXO 2 – Questionário

**Pontifícia Universidade Católica de Goiás –
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Departamento de Biologia – Mestrado em Genética**

Projeto: DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO PAPILOMAVIRUS
HUMANO (HPV) EM MULHERES HIV-POSITIVAS E EM
CONTROLES DE GOIÂNIA-GO

Nome: _____ Data de Nascimento: __/__/__

Endereço: _____

Telefone: _____

Naturalidade: _____ Procedência: _____

Profissão: _____ Estado Civil: _____

Escolaridade: _____ Renda mensal: _____

Raça/Cor: _____ Paridade: G: _____/P: _____/A: _____

Idade à primeira relação sexual: _____ Número de parceiros: _____

Uso de drogas ilícitas _____

Tabagismo: _____ Etilismo: _____

Uso de preservativos:

(1) Frequentemente (2) Ocasionalmente (3) Raramente (4) Nunca

Data do último exame ginecológico __/__/__

Local: _____

História de prostituição _____ Contato homossexual: _____

Já recebeu transfusão sanguínea? _____ Quando? __/__/__

Data do diagnóstico da AIDS __/__/__ Local: _____

Último exame CD4+/CD8+: __/__/__

Último exame de carga viral do HIV __/__/__

Estágio clínico da infecção pelo HIV _____

Sintomas relacionados ao HIV _____

Hospitalizações? _____

Prescrição de drogas antiretrovirais _____

Tratamento: Início em: ___/___/___

Protocolo: _____ Regime: _____

Data da coleta: _____/_____/_____