

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**Prevalência, Frequência de Genótipos e de Variantes de  
Papilomavírus Humanos em Mulheres  
Co-infectadas com o Vírus da Imunodeficiência Humana  
Tipo 1 no Distrito Federal e Entorno**

Daniela Marreco Cerqueira

Brasília

2007

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**Prevalência, Frequência de Genótipos e de Variantes de  
Papilomavírus Humanos em Mulheres  
Co-infectadas com o Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1  
no Distrito Federal e Entorno**

Orientadora

Cláudia Renata Fernandes Martins

Suplente

Marcelo de Macedo Brígido

Daniela Marreco Cerqueira

Brasília

2007

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**Prevalência, Frequência de Genótipos e de Variantes de  
Papilomavírus Humanos em Mulheres  
Co-infectadas com o Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1  
no Distrito Federal e Entorno**

Daniela Marreco Cerqueira

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Cezar Martins de Sá – Universidade de Brasília

Profa. Dra. Elizabeth M. T. de Souza – Universidade de Brasília

Profa. Dra. Ildinete S. Pereira – Universidade de Brasília

Dra. Laura Sichero – Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o câncer

Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido (suplente) – Universidade de Brasília

**Colaboradoras:**

Ceres Resende Oyama (Hospital Universitário de Brasília - HUB)

Fádia Aguiar Amaral (Secretaria de Estado de Saúde do DF)

Geni Lima Câmara (Anvisa – Ministério da Saúde)

Maria Quitéria dos Santos (Secretaria de Estado de Saúde do DF)

Brasília

2007

*"As condições para conquista são sempre simples. Só devemos trabalhar um tempo, suportar um tempo, crer sempre e retroceder, jamais."*

(Sêneca)

À Prof<sup>a</sup> Cláudia Renata Fernandes Martins, minha amiga e orientadora, por ter existido na minha vida e me trazido ao mundo da Virologia, pela ajuda e confiança, e por ser um exemplo profissional e pessoal a ser seguido sempre.

Aos meus pais, Marília e Eduardo, pela vida, por me ensinaram a amar, pelo apoio incondicional e pelo incentivo a seguir sempre em frente e a enfrentar todos os desafios.

À minha família, principalmente minhas irmãs Mariana, Luísa e Carolina, pela companhia, amizade e pelo incentivo e compreensão com que sempre encararam meus estudos.

Ao meu marido, Ugo Eichler Vercillo, pela companhia, por entender minha ausência e por me apoiar sempre e em tudo com amor, respeito, compreensão e dedicação.

Aos profissionais dos serviços de saúde do DF e às mulheres que cooperaram com a doação de amostras por, anonimamente, tornarem possível esse trabalho.

Aos meus amigos, por tudo.

## AGRADECIMENTOS

Às amigas **Daniella Moraes, Natália Milanezi, Tainá Alencar, Patrícia Wyant e Nazle Veras**, por participarem desse estudo, ajudando-me em todas as etapas e tornando-se indispensáveis para a obtenção dos resultados aqui apresentados.

Ao meu grupo de pesquisa em Virologia da Universidade de Brasília, **Cláudia Renata F. Martins, Regina Amorim, Claudiner Oliveira, Daniella Moraes, Natália Milanezi, Nazle Veras, Patrícia Wyant, Tainá Alencar**, pela nossa união, por terem me auxiliado na execução desse trabalho, pela convivência amiga e pela troca constante de aprendizado.

Ao **Prof Marcelo Brígido**, por ter “adotado” nosso grupo de Virologia, pelo auxílio técnico, científico, administrativo e pessoal durante toda minha vida acadêmica.

Ao **Prof César Martins de Sá**, pelas valiosas e oportunas considerações na análise deste e de outros trabalhos.

A todos os membros da **Banca Examinadora**, pela participação e auxílio na consolidação deste estudo.

À **Dra Fádía Amaral**, à **Dra Ceres Oyama** e à **Dra Maria Quitéria**, por entenderem a importância desse trabalho, pelas amostras coletadas e, sobretudo, pelo atendimento dispensado às mulheres infectadas por HIV e atendidas na rede de saúde do DF.

À **Geni Neumann Noceti de Lima Câmara**, pelo exemplo de profissionalismo e pela colaboração indispensável em todas as etapas do meu caminho como bióloga.

À **equipe da Unidade Mista de Saúde da Asa Sul** pela ajuda inestimável na obtenção das amostras e dos dados referentes às mesmas.

A todas as pessoas que realizam o seqüenciamento automático no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília, no CENARGEM e na Universidade Católica por tornarem possível a execução deste trabalho.

Aos **técnicos do laboratório de Fitopatologia**, pela colaboração constante e valiosa.

À **Ana** e à **Sandra**, funcionárias da Secretaria do Departamento de Biologia Celular, por me receberem sempre com presteza e eficiência.

À **CAPES**, ao **Programa Nacional de DST/AIDS** do Ministério da Saúde, ao **CNPq** e à **FAP-DF** pelo apoio financeiro.

Aos **amigos e colegas da ANVISA**, pela amizade e pelo incentivo sempre.

Aos meus **familiares e amigos**, por existirem na minha vida.

## SUMÁRIO

<b>Apresentação,</b> -----	<b>09</b>
<b>Resumo,</b> -----	<b>10</b>
<b>Abstract,</b> -----	<b>11</b>
<b>Lista de Figuras,</b> -----	<b>12</b>
<b>Lista de Tabelas,</b> -----	<b>14</b>
<b>Lista de Siglas e de Abreviaturas,</b> -----	<b>15</b>
<b>Introdução,</b> -----	<b>17</b>
<b>Revisão Bibliográfica,</b> -----	<b>19</b>
Taxonomia dos HPVs, -----	19
Estrutura das partículas virais e organização do genoma, -----	20
Ciclo de Infecção Viral, -----	20
As proteínas virais, -----	23
A região reguladora – LCR, -----	28
O <i>enhancer</i> epitélio-específico do HPV, -----	31
Fatores de transcrição envolvidos no ciclo de vida do HPV, -----	31
Epidemiologia e fatores de risco, -----	35
Diagnóstico, -----	38
Genótipos, subtipos e variantes de HPV, -----	39
Os HPVs 16 e 18, -----	43
A co-infecção HIV – HPV, -----	46
Aspectos imunológicos da co-infecção HIV – HPV, -----	48
<b>Justificativa e Objetivos,</b> -----	<b>51</b>
<b>Metodologia,</b> -----	<b>54</b>
População de estudo, -----	54
Coleta de dados, -----	54
Coleta e processamento das amostras, -----	55
Detecção e genotipagem do HPV, -----	55
Análise das seqüências, -----	57
Caracterização dos variantes do genótipo 18 do HPV, -----	57
Análise filogenética do HPV-18, -----	58
Análise dos dados, -----	59

<b>Resultados, -----</b>	<b>61</b>
HPV X Citopatologia, -----	62
Genotipagem, -----	64
Variantes de HPV, -----	66
Variantes do HPV-18, -----	72
HPV x HIV, -----	79
<b>Discussão, -----</b>	<b>83</b>
Prevalência do HPV, -----	83
Diversidade genética, -----	85
HPV x Idade, -----	87
HPV x Laudo citopatológico, -----	87
Variantes do HPV, -----	90
HPV x HIV, -----	95
<b>Conclusões, -----</b>	<b>99</b>
<b>Perspectivas Futuras, -----</b>	<b>101</b>
<b>Referências Bibliográficas, -----</b>	<b>102</b>
<b>Anexos, -----</b>	<b>126</b>



## APRESENTAÇÃO

Durante minha graduação em Biologia, participei do Programa PIBIC (CNPq), desenvolvendo projetos na área de Virologia Molecular. Também participei do Programa RHAIE (CNPq), na área de diagnóstico molecular de doenças infecciosas. Nesse período, os vírus despertaram minha curiosidade e admiração. Como organismos relativamente pouco complexos podem ser capazes de se adaptar tão bem a diferentes pressões seletivas? Essa e outras perguntas reforçaram minha certeza sobre a área de maior interesse para mim: a Biologia Molecular e, mais especificamente, a Virologia. Dessa forma, logo após o término da Graduação, iniciei o Mestrado, que envolveu a caracterização molecular do HIV-1 no Distrito Federal, seguindo a linha de pesquisa em Virologia desenvolvida por nosso grupo na Universidade de Brasília.

O trabalho aqui apresentado busca contribuir para uma melhor avaliação da infecção pelo HPV em nossa região. Pretendemos determinar os genótipos do HPV que circulam em uma sub-população específica do Distrito Federal e Entorno: mulheres infectadas por HIV. Além disso, estudamos a variabilidade genética do HPV-18, um genótipo de alto risco incluído nas vacinas contra HPV e para o qual não existem dados no DF. Essas informações podem ser relevantes para o desenvolvimento de vacinas efetivas e para a terapêutica das pacientes diante da constatação da infecção por genótipos de HPV de alto risco oncogênico.

Diante da enorme preocupação relacionada à incidência crescente de infecção pelo HIV e AIDS no Brasil e no mundo, e do fato da infecção por HPV ser a infecção transmitida sexualmente mais comum em todo o mundo, considero primordial a pesquisa básica para nos auxiliar a compreender um pouco mais da dinâmica envolvida na co-infecção HIV-HPV.

Apesar de resultados ainda modestos, podemos começar a traçar um perfil sobre a variabilidade genética de vírus como HIV, HCV e HPV no Distrito Federal. Os dados obtidos a partir de nossas pesquisas podem ser bastante relevantes para o controle da infecção por esses vírus.

Atualmente, trabalho na Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa, na área de análise de registro de medicamentos biológicos e hemoterápicos. Assim, posso aplicar o conhecimento científico obtido ao longo de minha jornada acadêmica para avaliar produtos que serão utilizados por seres humanos, como, por exemplo, vacinas contra HPV e diversos outros vírus que fazem parte de nossas pesquisas.

## RESUMO

O presente trabalho descreve a diversidade genética do HPV em mulheres infectadas pelo HIV-1 no Distrito Federal e Entorno. Duzentas amostras cervicais de mulheres HIV-positivas foram submetidas a exame citopatológico cervical e à amplificação por PCR. As amostras positivas para DNA do HPV foram genotipadas por RFLP. A positividade para HPV foi 41%, com a maioria das amostras positivas para genótipos de alto risco oncogênico (72%). Cento e sessenta e uma amostras (80,5%) tinham alterações celulares benignas ou resultados citopatológicos normais e a frequência de HPV entre elas foi 29,2%. Por outro lado, a maioria das amostras com citologia alterada foi positiva para HPV (89,7%). Uma grande diversidade de genótipos foi observada: os HPV-16 e 18 foram os mais prevalentes (12,2%), seguidos pelos HPV-35, 33, 53, 58, 62 e 70 (7,3%), 33 e 66 (6,1%), 18, 31, 56 e 61 (4,9%), 71 (3,7%), 6b, 11, 39, 40 e 54 (2,4%) e 32, 59, 67, 68, 72, 85 e 102 (1,2%). Novos variantes dos HPV-11, 18, 33, 53, 59, 62, 66, 70, 81 e 102 foram detectados. Possíveis associações entre a detecção de HPV, a classificação citopatológica, a idade, a carga viral do HIV, a contagem de células CD4 e o tratamento anti-retroviral foram verificadas. Foi possível observar uma prevalência significativamente maior de infecção por HPV em mulheres com menos de 30 anos de idade. As análises estatísticas sugeriram que o nível de imunossupressão estava associado com a prevalência de anormalidades citológicas, mas não com a presença de infecção por HPV. A carga viral do HIV, por sua vez, estava associada com a detecção de DNA do HPV e de anormalidades citológicas. Não foi observada associação significativa entre a terapia anti-retroviral e a presença de HPV ou de anormalidades citológicas. Pode-se concluir que uma proporção elevada de mulheres HIV-positivas está co-infectada por HPV, e, muitas vezes, por genótipos oncogênicos desse vírus, mesmo em casos onde a avaliação citológica não revela resultados anormais.

## ABSTRACT

The present study describes the genetic diversity of human papillomaviruses in women infected by HIV-1 in the Federal District and cities around. Two hundred cervical smears of HIV positive women were submitted to cervical cytological examination and to PCR amplification. HPV DNA-positive samples were genotyped by RFLP. HPV prevalence was 41%, and most samples were positive for high-risk oncogenic HPV genotypes (72%). One hundred and sixty-one samples (80.5%) had benign cellular alterations or normal cytological results and the HPV DNA frequency among them was 29.2%. Otherwise, most samples (89.7%) with altered cytology were positive for HPV DNA. A high diversity of genotypes was observed: HPV-16 and -81 were the most prevalent (12.2%), followed by HPV-52 (9.8%), -35, -53, -58, -62, and -70 (7.3%), -33, and -66 (6.1%), -18, -31, -56, and -61 (4.9%), -71 (3.7%), -6b, -11, -39, -40, and -54 (2.4%), and -32, -59, -67, -68, -72, -85, and -102 (1.2%). New variants of the HPV-11, -18, -33, -53, -59, -62, -66, -70, -81 and -102 were detected. Possible associations between the detection of HPV, cytological classification, age, HIV viral load, CD4 cell count, and antiretroviral treatment were examined. We observed a significantly higher prevalence of HPV infection in women under the age of 30. Statistical analysis suggested that the level of immunosuppression was associated with the prevalence of cytologic abnormalities, but not with HPV infection. Otherwise, HIV viral load was associated with detection of HPV DNA and of cytologic abnormalities. A significant association between the use of antiretroviral therapy and the presence of HPV or the detection of cytologic abnormalities was not verified. It could be concluded that a high proportion of HIV-infected women are infected with HPV and, frequently, with oncogenic genotypes of this virus, even when cytological evaluation does not show abnormal results.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do genoma do HPV-16, -----	21
Figura 2. Ciclo de infecção do HPV no epitélio estratificado, -----	22
Figura 3. Degradação de p53 mediada por E6, -----	25
Figura 4. Associação de E7 a pRb, -----	27
Figura 5. Representação esquemática da LCR do HPV, -----	29
Figura 6. Modelo etiológico da infecção por HPV, -----	37
Figura 7. Genótipos de HPV no câncer cervical, -----	40
Figura 8. Árvore filogenética do HPV-18, -----	44
Figura 9. Representação esquemática da oncogênese associada ao HPV e as possíveis interações entre HPV e HIV nas lesões associadas, -----	49
Figura 10. Estimativa do número de pessoas vivendo com HIV, -----	51
Figura 11. Perfil eletroforético, -----	62
Figura 12. Distribuição dos laudos citopatológicos entre as pacientes do Distrito Federal e Entorno, -----	63
Figura 13. Taxas de positividade para DNA do HPV entre categorias de laudo citopatológico cervical, -----	63
Figura 14. Frequência dos genótipos de HPV entre as mulheres HIV- positivas no Distrito Federal e Entorno, -----	65
Figura 15. Perfil do polimorfismo de restrição do HPV-102,-----	66
Figura 16. Variabilidade genética no HPV-62, -----	67
Figura 17. Variabilidade genética no HPV-70, -----	68
Figura 18. Variabilidade genética no HPV-33, -----	68
Figura 19. Variabilidade genética no HPV-59, -----	69
Figura 20. Variabilidade genética no HPV-11, -----	70
Figura 21. Variabilidade genética no HPV-81, -----	70
Figura 22. Variabilidade genética no HPV-102, -----	71
Figura 23. Variabilidade genética no HPV-66, -----	71
Figura 24. Variabilidade genética no HPV-53, -----	72
Figura 25. Perfil eletroforético do HPV-18, -----	72
Figura 26. Variabilidade genética do gene E6 nas amostras de HPV-18, --	74
Figura 27. Variabilidade genética da LCR nas amostras de HPV-18, -----	75

Figura 28. Variabilidade genética do gene L1 nas amostras de HPV-18, --	76
Figura 29. Árvore filogenética das amostras de HPV-18, -----	78
Figura 30. Distância genética na LCR do HPV-18, -----	79
Figura 31. Relação entre a contagem de células T CD4+/ $\mu$ L e a frequência de amostras com relação à positividade ou não para infecção por HPV e à ocorrência ou não de anormalidades no laudo citopatológico, -----	80
Figura 32. Relação entre a carga viral do HIV e a frequência de amostras com relação à positividade ou não para infecção por HPV e à ocorrência ou não de anormalidades no laudo citopatológico, -----	81
Figura 33. Relação entre o uso de anti-retrovirais e a frequência de amostras com relação à positividade ou não para infecção por HPV e à ocorrência ou não de anormalidades no laudo citopatológico, -----	81

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Implicações funcionais da variabilidade gênica do HPV, -----	42
Tabela 2. Sequências dos <i>primers</i> utilizados na amplificação de fragmentos genômicos da LCR e dos genes E6 e L1 do HPV-18, -----	58
Tabela 3. Relação entre os laudos citopatológicos e a positividade para DNA do HPV, agrupados de acordo com a severidade das lesões, -----	64
Tabela 4. Prevalência dos genótipos de HPV entre as mulheres HIV e HPV-positivas, -----	65
Tabela 5. Relação entre os resultados de exames citológicos, a infecção por HPV e os marcadores da infecção por HIV (CD4+ e carga viral), -----	80
Tabela 6. Relação entre a presença de infecção por HPV, os marcadores da infecção por HIV (CD4+ e carga viral) e o tratamento anti-retroviral, -----	82

## LISTA DE SIGLAS E DE ABREVIATURAS

- AA** - Variante Asiático–Americano
- Af** - Variante Africano
- AIDS** - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- AIS** - Adenocarcinoma *in situ*
- AP-1** - Proteína Ativadora 1
- As** - Variante Asiático
- ASCUS** - Células Atípicas de Significado Indeterminado
- CBP** - Proteína de Ligação ao Elemento de Resposta ao cAMP
- CCI** - Carcinoma Cervical Invasivo
- CDC** - Centro para Controle e Prevenção de Doenças
- DF** - Distrito Federal
- E** - Variante Europeu
- EGF-R** - Receptor do Fator de Crescimento Epidermal
- GRE** - Elemento de resposta a glicocorticóides
- HAT** - Histona Acetil Transferase
- HDACs** - Histonas Deacetilases
- HIV** - Vírus da Imunodeficiência Humana
- HLA** - Antígeno Leucocitário Humano
- HPV** - Papilomavírus Humano
- HSIL** - Lesão Intra-Epitelial Escamosa de Alto Grau
- IL** - Interleucina
- IARC** - Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
- INCA** - Instituto Nacional do Câncer    **ITS** - Infecção Transmitida Sexualmente
- KRF-1** - Fator de Transcrição específico de queratinócitos
- LCR** - Região Longa de Controle (*Long Control Region*)
- LSIL** - Lesão Intra-Epitelial Escamosa de Baixo Grau
- MARs** - Regiões de Ancoragem à Matriz Nuclear
- MHC** - Complexo Principal de Histocompatibilidade
- NF1** - Fator Nuclear 1
- NIC** - Neoplasia Intra-Epitelial Cervical
- Oct-1** - Fator de Ligação em Octâmero -1
- OMS** - Organização Mundial de Saúde

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

**Ori** – Origem de Replicação

**Pap** - Papanicolau

**PCR** - Reação em Cadeia da Polimerase

**pRb** - Proteína do Retinoblastoma

**PRE** - Elemento de Resposta à Progesterona

**RFLP** - Polimorfismo do Tamanho de Fragmentos de Restrição

**Sp1** - Fator Promotor Seletivo 1

**Tat** - Proteína de Transativação

**TEF** - Fator de Aumento Transcricional

**TNF** - Fator de Necrose Tumoral

**YY1** - Fator *yin-yang*



## INTRODUÇÃO

Na década de 1980, as técnicas recém-desenvolvidas da biologia molecular permitiram a detecção de diversos Papilomavírus Humanos (HPVs) em lesões mucosas benignas e malignas, tais como o câncer cervical e suas lesões precursoras, iniciando o estágio de grande expansão da pesquisa com papilomavírus (Gissmann & zur Hausen 1980). Dados atuais indicam a existência de mais de 200 papilomavírus, dos quais 120 podem infectar humanos, sendo, portanto, HPVs (Bernard 2005).

A infecção pelos HPVs é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma cervical. O advento das técnicas moleculares permitiu uma melhor compreensão da biologia desses vírus. Globalmente, o HPV é a infecção transmitida sexualmente (ITS) mais comum, apesar de haver uma variabilidade regional significativa na prevalência do HPV, mesmo em regiões bem próximas e com ancestralidade comum, o que pode ser devido a diferenças nos padrões sexuais e culturais. Estima-se que, a cada ano, mais de seis milhões de pessoas sejam infectadas por HPV genital. Mais de 50% dos adultos sexualmente ativos irão se infectar pelo HPV em algum momento da vida. Alguns estudos sugerem, ainda, que até 80% das mulheres sexualmente ativas terão sido infectadas por HPV antes dos 50 anos de idade. A infecção por HPV pode causar displasia epitelial e câncer, mais frequentemente no colo do útero, além de tumores benignos na genitália e na laringe (Saslow *et al.* 2007; Kotloff *et al.* 1998; Koutsky 1997).

O câncer de colo do útero é o segundo câncer mais comum em mulheres no mundo todo. A cada ano são diagnosticados, aproximadamente, 500.000 novos casos de câncer cervical, com 273.000 mortes associadas a esse tipo de câncer (Franco & Harper 2005). O impacto do câncer de colo do útero é maior em relação ao dos outros tipos de câncer por afetar mulheres de 30 a 60 anos, quando estão no pico da vida familiar e da produtividade. Nos países desenvolvidos, os programas de triagem que utilizam o exame de Papanicolau reduziram as taxas de câncer em 75%. Mundialmente, mais de 80% dos óbitos decorrentes do câncer de colo do útero ocorrem nos países em desenvolvimento, onde a precariedade dos programas de triagem ainda resulta em uma alta incidência desse tipo de câncer (Mohan & Ind 2004).

Devido à alta morbidade e mortalidade associadas ao HPV, estudos de epidemiologia e biologia molecular têm dado grande atenção a esses vírus, com o

objetivo de entender melhor a patogenicidade e infectividade e, assim, estabelecer terapias mais adequadas para as infecções e lesões associadas.

A análise da diversidade genética do HPV é relevante, uma vez que orienta o desenvolvimento de métodos de diagnóstico confiáveis e o monitoramento epidemiológico em determinadas populações, podendo, ainda, ser útil em estudos de taxonomia e de evolução desses vírus. Além disso, é importante na verificação da patogenicidade diferenciada, devido à associação positiva ou negativa de certos HPVs às lesões cervicais. Essa capacidade distinta de indução de tumores pode ser resultado de pequenas diferenças adaptativas de cada isolado viral (de Boer *et al.* 2005; Chaturvedi *et al.* 2005; Yamada *et al.* 1997).

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

***Taxonomia dos Papilomavírus Humanos.*** Os HPVs pertencem à família *Papillomaviridae*, na qual os vírus que infectam, preferencialmente, a mucosa oral ou anogenital em humanos e primatas pertencem ao gênero *Alphapapillomavirus* e os que infectam, preferencialmente, a pele de humanos pertencem aos gêneros *Betapapillomavirus*, *Gamma papillomavirus*, *Nupapillomavirus* e *Mupapillomavirus* (Fauquet *et al.* 2005). Em 1992, a infecção por HPV foi reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como a principal causa de câncer cervical (Chow & Broker 1997).

Os HPVs são classificados em mais de 100 genótipos, sendo nomeados pela abreviação HPV seguida de um número que é dado seqüencialmente, à medida que diferentes tipos são descobertos. Os HPVs são classificados com base em suas propriedades genômicas e não sorológicas, devido à dificuldade de se estabelecer um sistema de cultura de células para esses vírus (Bernard *et al.* 1994; LANL 1997).

A classificação atual dos HPVs em genótipos baseia-se na comparação de seqüências de nucleotídeos do gene L1. Cada genótipo de HPV difere dos outros em, pelo menos, 10% na seqüência de nucleotídeos de L1. Em casos nos quais a diferença na seqüência desse gene varia entre 2 e 10%, o isolado é considerado um subtipo. Variantes de um determinado genótipo diferem em menos de 2% do isolado original, denominado “protótipo” ou “genoma de referência”. Há maior divergência intragenótipo na região longa de controle (LCR), não-codante, onde variantes podem diferir em até 5%. Para identificação de um variante, pode-se seqüenciar uma pequena parte do genoma do HPV e denominar de variante cada isolado que difira do protótipo em pelo menos um nucleotídeo (Bernard *et al.* 2005; Bernard 2005; Yamada *et al.* 1997; Bernard *et al.* 1994; Ho *et al.* 1993).

Os genótipos são subdivididos em cutâneos, que infectam a pele e são comumente encontrados em pessoas aparentemente saudáveis, e mucosotróficos, que infectam as mucosas urogenitais, anais e ororrespiratória (Sterling & Tyring 2001). Dentre os mais de 100 genótipos de HPV descritos, cerca de 30 podem infectar o trato genital (Bernard 2005). Esses HPVs mucosotróficos podem ser ainda considerados como de baixo risco (ex: HPVs 6, 11, 42, 43 e 44) ou alto risco (ex: HPVs 16, 18, 31, 33, 45, 58), de acordo com o potencial de progressão para neoplasias (Storey *et al.* 1988). A manifestação patológica da infecção pode ser uma tumoração benigna, verruga

ou papiloma, associada aos HPVs de baixo risco. Por outro lado, condições malignas como displasia e neoplasia intraepitelial cervical (NIC) estão associadas aos HPVs de alto risco. Os HPVs de alto risco possuem potencial oncogênico elevado, sendo considerados os principais causadores de neoplasias cervicais em todo o mundo (Clarke & Chetty 2002; Delius *et al.* 1998; zur Hausen 1991; Syrjanen *et al.* 1985; Gissmann *et al.* 1983; Pilotti *et al.* 1982).

Como a sorologia não é utilizada para classificar os HPVs, o conhecimento da variabilidade genética é fundamental para estabelecer a taxonomia desses vírus.

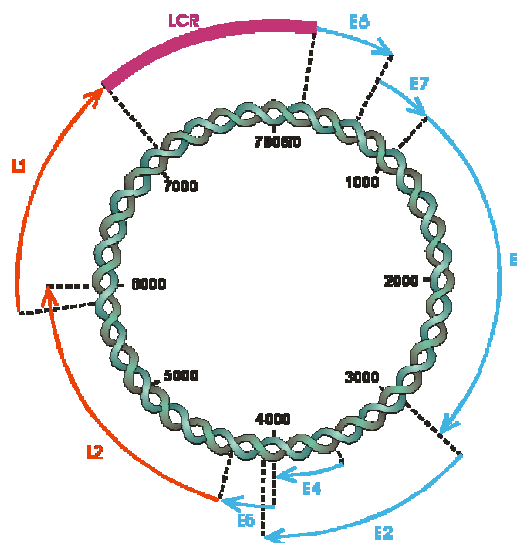
**Estrutura das partículas virais e organização do genoma.** O HPV é um vírus de capsídeo não-envelopado. Seu DNA de dupla-fita associado às histonas celulares H2a, H2b, H3 e H4 forma um complexo semelhante à cromatina. As partículas virais ou vírions possuem 55 nm de diâmetro. O capsídeo apresenta simetria icosaédrica e é formado por duas proteínas diferentes, L1 e L2. O genoma viral é formado por uma única molécula de DNA circular, com aproximadamente 8000 pares de bases (pb), divididos em seis genes precoces (E - *early*), dois genes tardios (L - *late*) e uma região de controle longa e não-codificadora (LCR - *long control region*) (Burd 2003; Gissmann & Zur Hausen 1976).

Apesar de existirem diversos genótipos de HPV, a estrutura básica do genoma é análoga entre eles. Todas as regiões abertas de leitura (ORFs - *Open Reading Frames*) estão localizadas em uma mesma fita de DNA. O genoma do HPV apresenta três regiões bem definidas: a região da fase precoce do ciclo de multiplicação viral (E), que codifica as proteínas não estruturais E1, E2, E4, E5, E6 e E7; a região da fase tardia (L), responsável pela síntese das proteínas do capsídeo L1 e L2; e a região reguladora, LCR (Sterling & Tyring 2001) (Figura 1).

**Ciclo de Infecção Viral.** O HPV é um vírus epiteliotrófico que infecta as células basais da pele ou da mucosa, preferencialmente nas junções escamo-colunares. Essas junções estão em constante ciclo de crescimento, dano e reparo, o que leva à metaplasia. A área metaplásica, denominada zona de transformação, é o local primário da tumorigênese induzida pelo HPV. A presença dessas junções no trato cervical/genital, no canal anal, na cavidade oral e na laringe pode explicar a predominância das lesões relacionadas ao HPV nesses órgãos (Derkey & Darrow 2000; Palefsky 2000).

Após a infecção, os HPVs induzem proliferações celulares cutâneas ou da mucosa. A proliferação dessas células é limitada e a infecção frequentemente regride de forma espontânea. O vírus pode ter acesso às células da camada basal do epitélio por

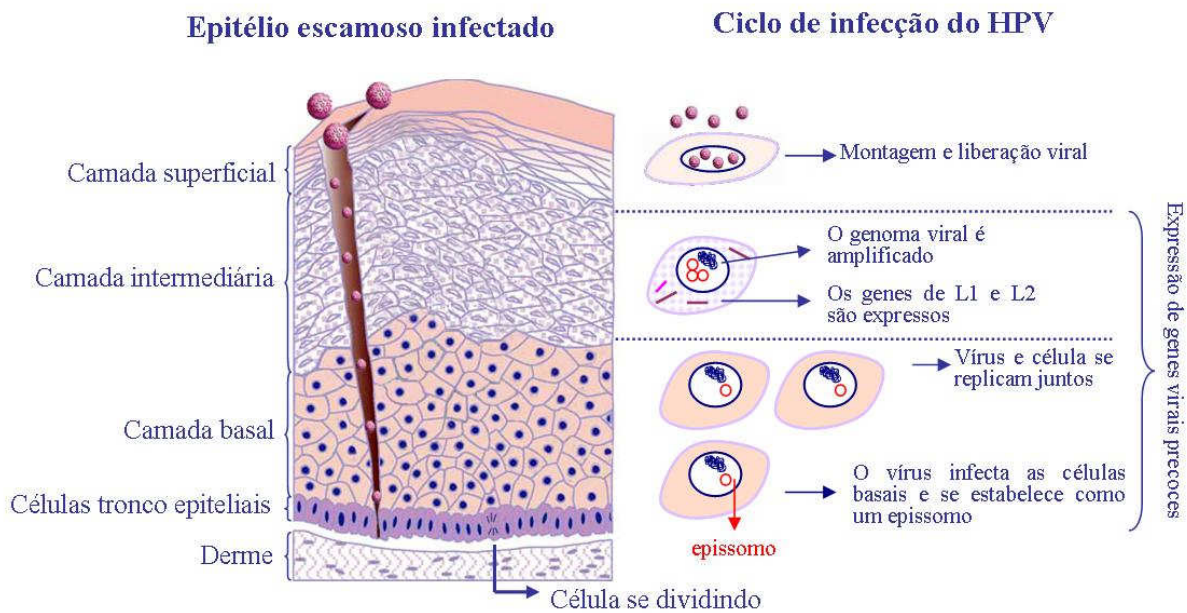
meio de micro lesões ou abrasão, que ocorrem na pele ou mucosa por contato direto, como resultado, por exemplo, de atividade sexual ou durante o parto (Schneider 1994).



**Figura 1.** Representação esquemática do genoma do HPV-16. Observam-se na figura a região precoce, responsável pela síntese das proteínas não estruturais E1, E2, E4, E5, E6 e E7, a região tardia, que codifica as proteínas estruturais L1 e L2, e a região reguladora ou LCR. As setas, ao final de cada gene, indicam a direção única em que ocorre a transcrição dos genes do HPV. Na parte interna da figura estão indicadas as posições nucleotídicas no genoma viral a cada 1000pb.

Os papilomavírus são espécie-específicos e estão perfeitamente adaptados aos tecidos dos seus hospedeiros naturais, a célula epitelial em diferenciação da pele ou mucosa, e exploram a maquinaria celular em benefício próprio. O ciclo inicia-se quando partículas infecciosas alcançam a camada basal do epitélio, devido à presença de micro lesões, onde ligam-se e entram nas células. O ciclo de replicação no epitélio pode ser dividido em duas partes. Primeiro, o genoma viral é replicado e mantido por períodos variáveis de tempo em baixo número de cópias nas células inicialmente infectadas, mas que ainda se replicam. As proteínas virais E1 e E2, expressas na camada basal, são essenciais para essa replicação do DNA. Segundo, assim que as células basais prosseguem para o compartimento suprabasal, elas perdem sua habilidade de divisão e iniciam o programa de diferenciação terminal. Nessas camadas mais distais, as proteínas E6 e E7 são expressas. Essas proteínas promovem proliferação celular e retardam a diferenciação. Quando as células infectadas diferenciam-se em células escamosas, a proteína E4 e as proteínas tardias L1 e L2 são expressas. Os papilomavírus replicam-se nesse compartimento e, para sua liberação, tiram vantagem da descamação das células epiteliais que ocorre como consequência da renovação natural nas camadas superficiais

do epitélio (Figura 2) (Doorbar 2006; Munoz *et al.* 2006; Pray & Laimins 1995; Bedell *et al.* 1991).



**Figura 2.** Ciclo de infecção pelo HPV no epitélio estratificado, mostrando as mudanças de expressão gênica até a liberação de novas partículas infecciosas nas camadas celulares diferenciadas. Adaptado de Doorbar 2005.

A natureza do receptor de superfície celular utilizado para entrada viral ainda não é conhecida, mas sulfato de heparina e proteoglicanos estabilizadores foram sugeridos como receptores das células epiteliais para o HPV (Jô & Kim 2005; Giroglou *et al.* 2001). Uma vez dentro da célula, o DNA viral é transportado até o núcleo, onde os genes virais são expressos. Após a infecção, o vírus entra em um período de latência antes do início da formação de tumores (Sterling & Tyring 2001).

Na camada basal, o DNA viral é mantido na forma epissomal em um número de 20 a 50 cópias por célula (Chow & Broker 1997). A proliferação é mediada por transcritos derivados dos genes precoces, que são expressos a partir do promotor precoce por processamento diferencial dos mRNAs. Os genomas de todos os HPVs são transcritos em uma única direção e todos os transcritos são policistrônicos (Bernard 2002; Higgins *et al.* 1992). O processamento do pré-mRNA gera uma grande diversidade de mRNAs, sendo esse processo essencial para a expressão gênica diferencial durante o ciclo de infecção (Sterling & Tyring 2001). O processamento do RNA parece regular, também, os níveis de produção das proteínas precoces e tardias (Figura 2) (Doorbar 2006; Turek & Smith 1996).

As **proteínas virais**. L1 e L2 são as proteínas estruturais que formam o capsídeo viral, presentes em maior e em menor número, respectivamente (L1 apresenta uma quantidade 30 vezes maior que L2). Quando L2 está presente, a formação do capsídeo *in vitro* é aumentada em 100 vezes, sugerindo que L2 pode ser importante no empacotamento do DNA ou na montagem do vírus (Hagensee *et al.* 1993). L2 pode também ter um papel importante em recrutar genomas virais para encapsidação, ligando-se ao DNA viral recém replicado e, subseqüentemente, recrutando L1 para criar novos vírions (Hebner & Laimins 2006).

L1 e L2 são expressas tardiamente no ciclo de infecção viral, em células suprabasais altamente diferenciadas. Após a amplificação, os genomas do HPV são empacotados como cromatina em capsídeos virais compostos de L1 e L2. Os vírions do HPV são compostos de 360 monômeros de L1 montados em 72 estruturas pentaméricas, denominadas capsômeros. Como outros vírus, os capsídeos do HPV podem passar por um processo posterior de maturação antes de serem liberados da célula (Hebner & Laimins 2006).

A proteína E2 tem, aproximadamente, 45 kDa, contendo um domínio N-terminal, de aproximadamente 200 aminoácidos, com a propriedade de ativar a transcrição, uma região em dobradiça de comprimento variável e um domínio C-terminal de ligação ao DNA com cerca de 70 aminoácidos. A proteína E2 existe como um homodímero e se liga especificamente à seqüência nucleotídica palindrômica ACCGNNNGCCT (McBride *et al.* 1991).

E2 se liga a motivos na LCR do HPV e é responsável, em grande parte, pela regulação da expressão dos genes virais precoces (McBride *et al.* 1991; Phelps & Howley 1987). Essa proteína pode agir como um ativador ou repressor da atividade transcricional, dependendo da proximidade dos sítios de ligação em relação ao promotor precoce do HPV, ao qual se liga (Steger *et al.* 1996). Na infecção por HPV-16, a proteína E2 completa é um repressor da expressão de E6 e E7, controlando o nível de proliferação das células basais infectadas. Em lesões de alto grau e cânceres, o DNA do HPV está quase sempre integrado ao genoma do hospedeiro, causando a perda da ORF de E1 e o rompimento da ORF de E2. No entanto, as ORFs de E6 e E7 são preservadas e permanecem ativas em linhagens celulares de câncer cervical e neoplasias associadas ao HPV (Durst *et al.* 1992). Isso resulta no término da amplificação do DNA viral e na ativação constante do promotor precoce do HPV (Stoler *et al.* 1992).

E2 também se associa a E1 estabilizando-a na origem de replicação viral, localizada próxima ao gene E6 na região 3' da LCR. Além disso, E2 auxilia E1 no recrutamento, para a origem de replicação, de proteínas celulares necessárias para a replicação do DNA viral. Entretanto, E2 parece não ser necessária durante a alongação (Liu *et al.* 1995). A proteína E1 é uma ATPase dependente de DNA e uma DNA helicase, se associando à subunidade  $\alpha$  da DNA polimerase. Também é importante para a iniciação e alongação da replicação do DNA viral (Conger *et al.* 1999).

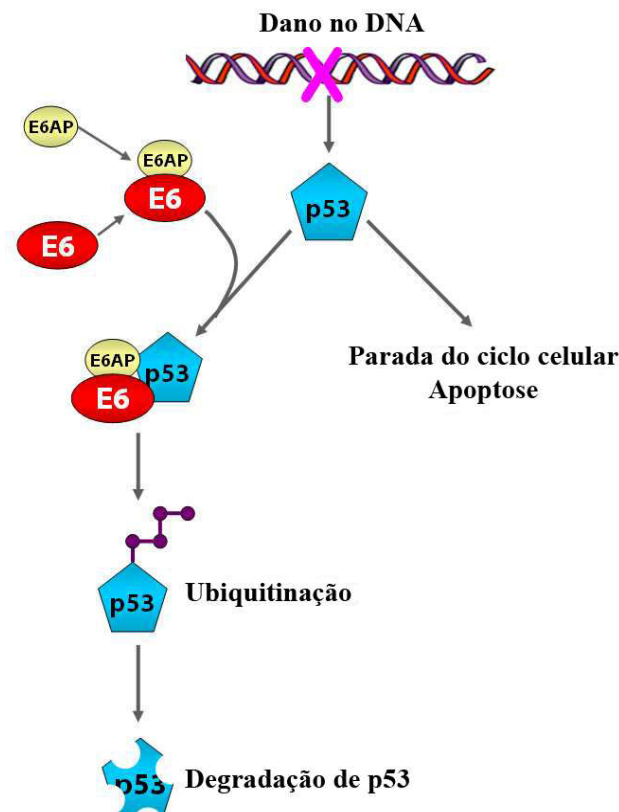
A expressão da proteína E4 precede a das proteínas estruturais do capsídeo e parece estar envolvida na liberação do vírus. A proteína E4 é formada a partir da ORF de E4 e o início da ORF de E1. A proteína fusionada E1<sup>E4</sup> possui cinco aminoácidos de E1 no C-terminal, sendo o restante do polipeptídeo derivado do gene E4. E1<sup>E4</sup> se associa aos filamentos intermediários do citoesqueleto quando expressa *in vivo*. Isso pode levar a um comprometimento da estrutura da célula infectada, facilitando a lise celular e a liberação das partículas virais (Doorbar *et al.* 1997; Doorbar *et al.* 1986).

O gene precoce E5 codifica um peptídeo hidrofóbico de 44 aminoácidos, que se liga a estruturas de membrana celular como o aparato de Golgi, retículo endoplasmático e membrana nuclear. A proteína E5 apresenta atividade de transformação celular. Isso parece ocorrer pela capacidade de associação de E5 à subunidade de 16 kDa da ATPase de prótons vacuolar. O mecanismo de ação de E5 reduz a acidificação dos endossomos, inibindo a degradação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGF-R) internalizado e prolongando sua retenção nas vesículas intracelulares (Straight *et al.* 1993). Apesar de não se saber a função exata de E5, diversas de suas ações foram descritas. Foi relatado que E5 do HPV-16 interfere com o citoesqueleto de actina e bloqueia o tráfego endocítico; modula a sinalização pelo receptor do fator de crescimento epidermal; induz a expressão de c-jun; e reduz a expressão de moléculas de superfície do MHC de classe I. Com relação a seu papel na tumorigênese, foi demonstrado que E5 induz fibroblastos a formar colônias, aumenta a eficiência da imortalização de queratinócitos por E6 e E7 e prejudica significativamente a comunicação célula-célula. Também foi relatado que E5 inibe a expressão do supressor de tumor p21, o que sugere que ela pode cooperar com E6 e E7 para transformar queratinócitos. É também possível que E5 interfira com a habilidade do sistema imune em eliminar as células infectadas por prejudicar a sinalização celular



(Garnett & Duerksen-Hughes 2006). No caso dos papilomavírus bovinos (BPV), a proteína E5 é a principal proteína envolvida na transformação celular, podendo, mesmo na ausência de outros genes virais, provocar transformação celular estável (Bohl *et al.* 2001; Settleman *et al.* 1989).

A proteína transformante E6 tem, aproximadamente, 160 aminoácidos e, nos HPVs de alto risco, desativa p53 acelerando sua degradação proteolítica mediada por ubiquitina. Isso ocorre por meio da formação de um complexo entre E6 e a proteína associada a E6 (E6AP), um polipeptídeo celular que tem atividade de ubiquitina ligase. Esse complexo atua marcando especificamente p53 para a degradação, por meio da ubiquitinação (Ciechanover 1994). p53 é uma proteína supressora de tumor, que normalmente é regulada positivamente em resposta a danos no DNA ou infecção viral. A proteína p53 age induzindo a expressão de várias proteínas celulares, estando algumas delas envolvidas na indução da apoptose (Hebner & Laimins 2006; Lechner & Laimins 1994; Kesis *et al.* 1993) (Figura 3).



**Figura 3.** Degradação de p53 mediada por E6. Danos no DNA induzem a ativação de p53 levando tanto à parada do ciclo celular quanto à apoptose. E6 se liga a E6-AP e o complexo formado se liga a p53. E6-AP ubiquitina p53, que é rapidamente degradada pelo proteossoma. Modificado de Jô & Kim 2005.

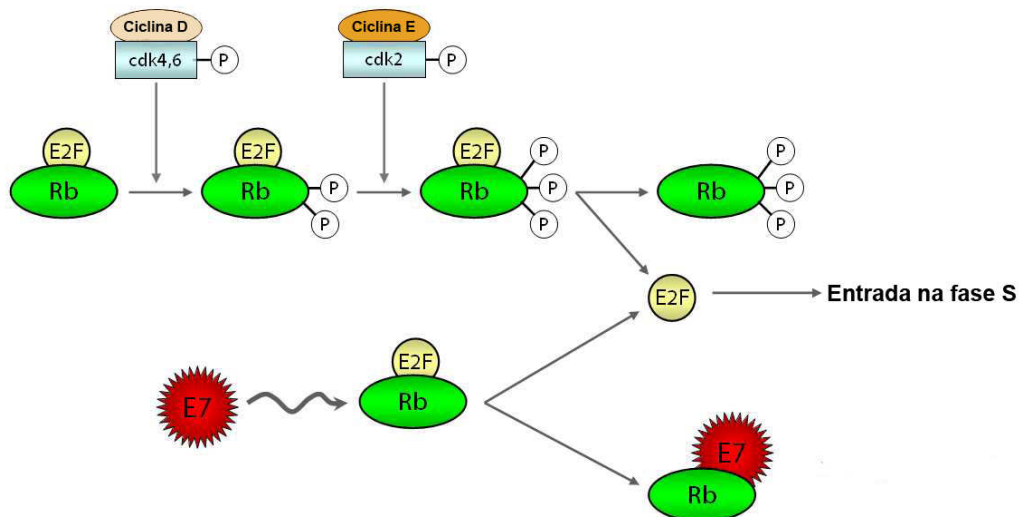
Embora as proteínas E6 de todos os HPVs genitais tenham provavelmente alguma propriedade de ligação à p53, somente as dos genótipos de alto risco se ligam com alta afinidade e provocam sua degradação (Lechner & Laimins 1994; Crook *et al.* 1991). As proteínas E6 de HPVs de alto risco podem se ligar a vários outros polipeptídeos celulares, incluindo E6BP, uma proteína ligadora de cálcio (Chen *et al.* 1995) e o fator de resposta a interferon-3, um fator transcricional normalmente ativado em resposta à infecção viral. As conseqüências dessas ligações para o ciclo de infecção viral do HPV ainda não foram determinadas. Também foi demonstrado que E6 interage e leva à degradação de proteínas contendo domínios PDZ. As proteínas PDZ estão envolvidas na sinalização celular e adesão célula-célula. A associação de E6 com proteínas PDZ parece ter um papel importante no ciclo viral do HPV. A ligação de E6 a proteínas PDZ pode também contribuir para a carcinogênese, pois algumas delas têm funções supressoras de tumor (Hebner & Laimins 2006; Thomas *et al.* 2002).

Outra função importante da proteína E6 de alto risco é a ativação da telomerase em células infectadas. Em células normais, ciclos repetidos de replicação de DNA resultam no encurtamento dos telômeros, eventualmente produzindo instabilidade cromossomal e senescência celular. Foi demonstrado que as proteínas E6 de HPVs de alto risco aumentam o tamanho telomérico em células epiteliais por ativar a subunidade catalítica da enzima telomerase, hTERT. Além de estender a vida de células epiteliais para produção de progênie viral, esse efeito também influencia a carcinogênese induzida por HPV, pois a super expressão de hTERT em conjunção à expressão de E7 pode ser suficiente para imortalizar queratinócitos humanos primários (Hebner & Laimins 2006; Klingelutz *et al.* 1996). No entanto, apesar de E6, junto com E7, imortalizar eficientemente células epiteliais humanas, não é suficiente na indução da transformação de células humanas, sendo necessárias alterações genéticas adicionais (Li *et al.* 2005; Munger *et al.* 1989).

A oncoproteína E7 é um polipeptídeo predominantemente nuclear que contém, aproximadamente, 98 aminoácidos e incorpora 3 regiões conservadas chamadas CR1, CR2 e CR3. O domínio CR1 compreende o terminal amino, CR2 contém um motivo LXCXE que medeia a ligação de E7 a membros da família de proteínas supressoras de tumor do retinoblastoma (Rb) e CR3 consiste de dois motivos de dedos de zinco. A região N-terminal interage com Rb e a C-terminal é importante para a estabilidade de

E7. Esta proteína tem uma meia-vida curta e é rapidamente degradada pelo proteossoma (Hebner & Laimins 2006).

A associação de E7 a membros da família da proteína do retinoblastoma, incluindo pRb, p107 e p130, explica como E7 exerce seus efeitos estimulatórios de proliferação celular. Em condições fisiológicas, a proteína Rb é um regulador negativo do ciclo celular na transição da fase G1 para S e seu estado de fosforilação é regulado no ciclo celular. No estado hipofosforilado, Rb se liga ao fator transcricional E2F durante a fase G1. Com a fosforilação de Rb por quinases dependentes de ciclinas (CDK), em resposta a sinais de proliferação celular, o complexo Rb/E2F se dissocia e E2F é liberado para agir como um ativador transcricional de genes envolvidos na progressão do ciclo celular (Weinberg 1995; Dyson *et al.* 1989). A associação de E7 à Rb impede a ligação desta a E2F, promovendo então a progressão para a fase S do ciclo celular (Jones & Münger 1997). É interessante que a habilidade de E7 de ligar-se e degradar pRb é mediada por 2 regiões diferentes da oncoproteína. O motivo LXCXE, necessário para ligação de Rb, está na região CR2 de E7, enquanto os resíduos importantes para degradação de Rb são encontrados no N-terminal. A degradação de Rb é característica primária de proteínas E7 de alto risco, contribuindo na carcinogênese cervical (Hebner & Laimins 2006; Münger & Howley 2002) (Figura 4).



**Figura 4.** Associação de E7 a pRb. A fosforilação sequencial de pRb por complexos ciclina/cdk inibe a atividade repressora de pRb. E7 se liga a pRb em sua forma hipofosforilada. Essa ligação desfaz o complexo entre pRb e o fator de transcrição celular E2F, resultando na liberação de E2F, o que permite que a célula entre na fase S do ciclo celular. Modificado de Jô & Kim 2005.

Além da ligação a membros da família Rb, E7 influencia a transcrição induzida por E2F por outros meios. Foi demonstrado que E7 interage com as desacetilases de histona de classe I (HDACs), que atuam como co-repressores transcricionais e que a ligação de E7 a HDACs aumenta especificamente os níveis de transcrição mediada por E2F em células em diferenciação, levando as células à fase S (Hebner & Laimins 2006).

Outra consequência da expressão de E7 de alto risco é a indução de instabilidade genômica, um fenômeno observado em muitas malignidades. Células que expressam E7 exibem irregularidades centrossomais, tais como números anormais de centrossomos. Essas atividades parecem ser independentes da habilidade de E7 em impedir as funções associadas a Rb (Hebner & Laimins 2006).

**A região reguladora – LCR.** A replicação viral e a transcrição dos genes E6 e E7 são controladas pela região reguladora, LCR. Essa região possui o promotor responsável pela transcrição de E6 e E7, além de vários sítios de ligação para fatores transcricionais celulares e virais. A LCR é um segmento, não codificador, de aproximadamente 850 pb, localizado entre o final de L1 e o início do gene E6 (Figura 1) (O'Connor *et al.* 1995).

Essa região pode ser dividida em 3 partes: a região 5', o segmento central e a região 3', que está localizada diretamente *upstream* dos genes E6 e E7. A transcrição do RNA começa a partir do promotor na região 3' da LCR, diretamente *upstream* do gene E6. Esse promotor é chamado de P97 para HPV-16 e P105 para HPV-18 (Thierry *et al.* 1987). O promotor consiste de um TATA-box e um sítio de iniciação da transcrição que são regulados por diferentes *enhancers* mapeados nas regiões central e 3' da LCR e onde ligam-se fatores celulares de transcrição. A região 3' da LCR também contém dois sítios de ligação para o fator de transcrição viral E2, fatores celulares Sp1 e YY1 e origens de replicação com sítios de ligação para a proteína viral E1 (Kissel'ov 2000).

O *enhancer* constitutivo, no segmento central da LCR, é mais ativo em células epiteliais e é dependente apenas de fatores celulares de transcrição. Sítios para vários fatores celulares incluindo AP-1, NF1, Oct1, TEF1, TEF2, YY1, e para hormônios esteróides são identificados nessa região. Todos esses fatores são ubíquos e podem atuar em diferentes tipos celulares. A região 5' da LCR contém sinais para terminação e poliadenilação de transcritos virais tardios e um sítio de ligação à matriz nuclear (Figura 5) (Kissel'ov 2000).

Nos HPVs genitais, a LCR contém quatro sítios de ligação para a proteína viral E2 em posições conservadas. Dados referentes ao efeito de E2 sobre a transcrição dos genes E6 e E7 são contraditórios. Por um lado, os produtos do gene E2 podem atuar



níveis de atividade do promotor de E6/E7 (Tan *et al.* 1994; Tan *et al.* 1992; Gloss & Bernard 1990).

Em células epiteliais diferenciadas, o promotor está ativado por SP1 junto com TFIID, resultando na estimulação da atividade do promotor. TFIID é um fator de transcrição responsável pelo posicionamento adequado da RNA polimerase II no sítio de início da transcrição por meio do reconhecimento do TATA-box, uma sequência rica em T e A à montante desse sítio de início. Desta forma, a transcrição é estimulada e, assim como as demais proteínas precoces, a proteína E2 também é transcrita (Gloss & Bernard 1990).

A proteína E2 traduzida se liga ao sítio 3 de ligação de E2 (#3, Figura 5a) e desloca Sp1, ativador do promotor de E6/E7. Isso leva a uma repressão fraca do promotor de E6/E7, já que o TATA-box ainda está livre para o reconhecimento por TFIID. Em altas concentrações, E2 desloca também TFIID do sítio de ligação #4 de E2 (#4, Figura 5a), levando à repressão eficiente do promotor (Tan *et al.* 1994; Tan *et al.* 1992).

A consequência desses vários eventos é uma retro alimentação, variando entre uma forte repressão, que poderia provocar o término do ciclo viral, e uma expressão acentuada, levando a célula infectada a progredir para a malignidade. Inicialmente ocorre a transcrição do genoma viral, e, à medida que as concentrações de E2 aumentam, ocorre a repressão da transcrição, impedindo a transcrição dos oncogenes. Dessa forma, os agentes infecciosos agressivos são impedidos de danificar ou mesmo matar o hospedeiro. O ciclo termina com a interrupção do gene E2, ocasionada pela integração do DNA viral no genoma celular, e consequente estímulo da transcrição de E6/E7, quando se observa uma proliferação celular acentuada (Bernard 2002; Shirasawa *et al.* 1986).

A transcrição dos genes E6 e E7 do HPV-18 inicia-se no promotor P105 e é regulada pela LCR. Para o genoma integrado do HPV-18, a expressão dos genes E6 e E7 está sob controle de fatores celulares de transcrição, incluindo AP-1, C/EBP $\beta$ , SP1, YY1 e KRF-1, que contribuem positiva ou negativamente para a regulação da atividade da LCR do HPV-18. Uma origem de replicação (*ori*) eficiente do HPV-18 foi localizada em um fragmento de 210 pares de bases, dos nucleotídeos 7766 a 7857 e 1 a 119. Ela contém três cópias do sítio de ligação a E2 e um possível sítio de ligação a E1 (E1BS). Na origem de replicação do HPV-18, há vários sítios de ligação para fatores de transcrição do hospedeiro, incluindo YY1, que se sobrepõe a E1BS, para Sp1 e para

proteína de ligação ao TATA-box (TBP). Sp1 e TBP são elementos transcricionais positivos e mutações nos sítios de ligação desses fatores de transcrição têm efeito negativo na replicação. A proteína YY1 interage com diversas proteínas, incluindo TBP, o fator de transcrição IIB, Sp1 e c-Myc. Em alguns momentos, YY1 e outros fatores de transcrição competem pela ligação a sítios adjacentes ou sobrepostos. Assim, dependendo do contexto da sequência, YY1 funciona como repressor ou como ativador da transcrição. A replicação eficiente a partir da ori do HPV é dependente das proteínas E1 e E2 (Figura 5b) (Lee *et al.* 1998).

**O enhancer epitélio-específico do HPV.** O promotor de E6/E7 dos HPVs genitais apresenta uma atividade moderada, mesmo na presença de Sp1 e sem a retroalimentação negativa promovida por E2. Para ser fortemente ativo, o promotor tem que ser estimulado por um *enhancer*, um segmento de aproximadamente 400 pb da LCR à montante do promotor de E6/E7. O promotor é separado do *enhancer* por um segmento de 100 pb que contém a origem de replicação (O'Connor *et al.* 1995).

Os *enhancers* dos HPVs genitais funcionam exclusivamente em células epiteliais. Essa propriedade transcricional é, provavelmente, a principal razão do ciclo do HPV ser restrito às células de origem epitelial. Uma explicação plausível para a especificidade epitelial da transcrição dos HPVs genitais seria a existência de um ou mais fatores de transcrição, ou co-fatores necessários para a transcrição, produzidos somente em células epiteliais (Cripe *et al.* 1987; Gloss *et al.* 1987).

#### **Fatores de transcrição envolvidos no ciclo de vida do HPV.**

❖ A proteína ativadora 1 (*activator protein-1* - AP-1) é composta de subunidades diferentes codificadas por genes das famílias gênicas *jun* e *fos*. Esse fator reconhece e liga-se, como heterodímero, a motivos TGANTCA (Angel *et al.* 2001). Os *enhancers* de todos os HPVs genitais contêm um a três sítios de ligação de AP-1 e sugere-se que esses sítios são de grande importância na atividade do *enhancer* dos HPVs. Foi proposto que AP-1 pode contribuir para a ativação epitélio-específica do *enhancer*, tendo um papel crítico durante a expressão de genes precoces do HPV, em particular na expressão das oncoproteínas E6 e E7 (Torres & Vidal 2002; Velazquez & Gariglio 2002; O'Connor *et al.* 1995).

❖ O fator nuclear 1 (*Nuclear factor 1* - NF1) liga-se a sequências TTGGCT/A (O'Connor *et al.* 1995), sendo um importante ativador dos *enhancers* de HPV (Chong *et al.* 1991). NF1 explica parte da especificidade epitelial do *enhancer* do HPV. Esse gene é expresso a partir de um dentre quatro genes de uma mesma família, dependendo do

tipo celular. Em células epiteliais NF1 é composto principalmente de subunidades derivadas do gene NF1-C, cujos produtos ativam a transcrição. Em células não epiteliais, entretanto, NF1 é composto principalmente de subunidades derivadas do gene NF1-X, cujos produtos não conseguem ativar a transcrição (Apt *et al.* 1993).

❖ Além de AP-1 e NF1, o fator de aumento transcricional (*Transcriptional enhancer factor-1* - TEF-1) é um fator implicado na especificidade epitelial. Foi mostrado que TEF-1 pode influenciar a atividade transcricional, uma vez que a proteína purificada *in vitro* pode se ligar a vários sítios localizados no *enhancer* de HPV-16. A maioria dos HPVs possui de 2 a 8 sítios potenciais de TEF-1. Em células epiteliais, este fator interage com um co-fator (co-fator de TEF-1), ausente na maioria dos outros tipos celulares (Ishiji *et al.* 1992).

❖ O fator de ligação em octâmero -1 (*Octamer binding factor -1* - Oct-1) reconhece motivos octaméricos ATGCAAAT, que podem ser encontrados de formas degeneradas e, ainda assim, são reconhecidos por Oct-1. No entanto, observa-se que as três bases que flanqueiam os sítios de ligação são importantes na determinação da afinidade de ligação. Quando presente em células epiteliais em concentrações fisiológicas, Oct-1 se liga a NF-1 estabilizando a ligação deste ao seu sítio de reconhecimento na extremidade 3' do *enhancer*. Esse evento provoca um aumento dos níveis de transcrição do genoma viral (O'Connor *et al.* 1995).

❖ Foi demonstrado que, por meio da cooperação com AP-1, o fator celular de transcrição específico de queratinócitos, KRF-1, exibe atividade de transativação específica de células epiteliais, visto que a inativação do motivo de ligação de KRF-1 resulta em forte redução da atividade do promotor de E6/E7 (Butz & Hoppe-Seyler 1993). Também foi demonstrada uma forte correlação entre a ligação de KRF-1 e a função do *enhancer*, sugerindo que esse fator é necessário para a atividade do *enhancer* em queratinócitos e um determinante principal da especificidade celular do HPV-18 (Mack & Laimins 1991).

❖ Os *enhancers* de alguns HPVs genitais ainda apresentam sítios de ligação para fatores de resposta à progesterona (*progesterone response element* - PRE) e glicocorticóides (*glucocorticoid response element* - GRE). Os receptores desses dois esteróides parecem reconhecer a mesma seqüência consenso, envolvendo o motivo TGTTCT (Chan *et al.* 1989). A transcrição estimulada por glicocorticóides e progesterona resulta na transformação aumentada de células em cultura (Chan *et al.* 1989; Gloss *et al.* 1987). Essas observações *in vitro* fornecem uma explicação molecular



para a evidência epidemiológica de que mulheres que são expostas a altos níveis de progesterona por longos períodos apresentam um risco maior de desenvolver câncer cervical (Moodley *et al.* 2003; Schiffman & Brinton 1995). A estimulação da expressão das oncoproteínas E6 e E7 por PRE ou GRE leva a uma maior propensão de células infectadas por HPV progredirem para o câncer cervical invasivo.

❖ O fator C/EBP $\beta$  (CCAAT *enhancer binding protein - beta*) é um membro de uma família de fatores transcricionais envolvidos na diferenciação celular (C/EBP). Em HPV-18, um aumento nos níveis de C/EBP $\beta$  resulta em forte repressão da atividade da LCR, por desfazer a ligação do complexo Proteína de Ligação ao TATAbox (TATAbox Binding Protein - TBP) – TATAbox (Bauknecht & Shi 1998).

❖ Os genes Myc (*cellular myelocytomatosis oncogene*) compreendem uma pequena família de genes que estão envolvidos no surgimento de diferentes tipos de tumor em humanos. c-Myc é capaz de desregular a proliferação celular e inibir a diferenciação celular. Sua expressão desregulada leva ao crescimento celular, reduz a adesão celular e promove metástase e instabilidade genômica. Muitos cânceres, inclusive o câncer cervical, apresentam níveis elevados de c-Myc. Assim, essa proteína desempenha um papel importante na transformação de células epiteliais (Subramanyam & Krishna 2006).

❖ A análise de segmentos da LCR de HPV-18 (Bauknecht *et al.* 1992) e -16 (May *et al.* 1994) revelou múltiplos sítios de ligação ao fator YY1 (*yin-yang factor - 1 - YY1*), um repressor transcricional (Galvin & Shi 1997). A proteína YY1 pode reprimir a transcrição suprimindo a atividade de AP-1 (O'Connor *et al.* 1996). Outra forma de ação de YY1 pode ser por competição com SP1 pela ligação a seus respectivos sítios, que estão sobrepostos na LCR (Dong & Pfister 1999). Foi observado que isolados de HPV-16, com deleções nos sítios de reconhecimento de YY1, apresentavam uma atividade transcricional reduzida, aparentemente provocada por outro repressor. O fator responsável por esse efeito foi identificado como sendo a proteína deslocadora de CCAAT (CDP/Cut) (O'Connor *et al.* 2000; O'Connor *et al.* 1998). CDP/Cut reprime seus genes alvos devido a sua alta concentração em células basais, sendo essa repressão reduzida à medida que sua concentração diminui durante a diferenciação celular.

As proteínas CDP/Cut e YY1 reprimem a transcrição pela formação de complexos com histonas desacetilases (HDACs). Essas proteínas alteram a posição de nucleossomos adjacentes, limitando o acesso de fatores transcricionais ao DNA viral (Yao *et al.* 2001). Esse mecanismo parece reprimir os HPVs em camadas basais do

epitélio, onde se observam altas concentrações de CDP/Cut e YY1. Já no processo de diferenciação, quando há um aumento na expressão do HPV, observa-se um decréscimo na concentração desses fatores de transcrição (Pattison *et al.* 1997).

À medida que há o decréscimo das atividades de CDP/Cut e YY1, durante a diferenciação epitelial, ocorre um aumento da atividade de AP-1. Os nucleossomos na LCR de HPV-16 e HPV-18 não estão posicionados aleatoriamente, mas estão localizados em posições precisas: um nucleossomo se sobrepondo ao *enhancer* viral, e um segundo sobreposto à origem de replicação e ao promotor de E6/E7. Apenas um único sítio de AP-1 entre os dois nucleossomos permanece desprotegido. A conservação dessa organização da cromatina, em particular entre o HPV-16 e -18, sugere um papel regulatório importante dos nucleossomos durante o ciclo de replicação dos HPVs (Stünkel & Bernard 1999).

Foi observado que AP-1 pode alterar a estrutura de nucleossomos por meio da interação com o co-fator CBP (*cAMP Response Element Binding Protein*), que possui atividade de histona acetilase, e da associação com a enzima histona acetilase (HAT). A atividade de histona acetilase caracteriza-se por adicionar grupos acetila às histonas a fim de que ocorra um “afrouxamento” dos nucleossomos, permitindo o acesso de proteínas da maquinaria de transcrição e replicação ao DNA (Bannister & Kouzarides 1996). Desta forma, AP-1 pode impedir o efeito da atividade de HDAC causado pela interação com YY1 e CDP/Cut. Os arranjos conservados dos sítios de AP-1, CDP/Cut e YY1, e o posicionamento dos nucleossomos nos HPV-16 e -18 sugerem que esses fatores alteram a cromatina dos HPVs, tornando-a inacessível, sob efeito de CDP/Cut e YY1, ou acessível, pela ligação de AP-1, à maquinaria de transcrição e replicação em diferentes camadas do epitélio estratificado (Stünkel & Bernard 1999).

Além da regulação da transcrição e replicação pela desacetilação de histonas, CDP/Cut causa ainda o deslocamento da proteína viral E1 de sua seqüência de reconhecimento. Como relatado anteriormente, E1 inicia a replicação e promove a elongação do DNA viral. CDP/Cut inibe a replicação viral, provavelmente, por competir com o fator de replicação E1 pela ligação aos sítios sobrepostos localizados na LCR (O'Connor *et al.* 2000).

❖ Segmentos de DNA curtos, de algumas centenas de pares de bases, com alta afinidade pela matriz nuclear são denominados de regiões de ancoragem à matriz nuclear (MARs) (Berezney *et al.* 1995). Os genomas de HPV-16 aderem *in vivo* às matrizes nucleares. Essas regiões do genoma viral com propriedades de se ligar à matriz

nuclear estão presentes em três segmentos genômicos localizados na região 5' da LCR (5'-LCR-MAR), no gene E6 (E6-MAR) e entre os genes E5 e L2, ou seja, entre as regiões precoce e tardia (Tan *et al.* 1998). O mecanismo de regulação pelas MARs ainda não foi esclarecido.

**Epidemiologia e fatores de risco.** O câncer cervical é a segunda causa de morte em mulheres em todo o mundo. Em muitos países em desenvolvimento, ainda é a principal causa de morte por câncer em mulheres. Altas incidências anuais de câncer são relatadas no Brasil, com diversos estudos epidemiológicos publicados envolvendo a prevalência de DNA de HPV no trato genital feminino e a história natural da infecção. Estudos referentes às vacinas contra HPV estão sendo conduzidos e um dos principais problemas é determinar de forma acurada que genótipos de HPV devem ser incluídos, pois variações geográficas na prevalência dos genótipos são observadas (Carvalho *et al.* 2005).

Os HPVs causam um grande número de lesões epiteliais benignas e malignas. As lesões não invasivas são tradicionalmente descritas como condilomas planos, displasias, neoplasias intra-epiteliais cervicais (NICs) e carcinomas *in situ*. A lesão invasiva mais freqüente é o carcinoma cervical invasivo (CCI) (<http://www.procelula.com.br/bethesda>). Estudos já demonstraram que a infecção por HPV precede o desenvolvimento das displasias cervicais de alto grau e este vírus está envolvido em até 99,7% dos casos de câncer cervical (Clarke & Chetty 2002). A infecção por HPV também está intimamente associada a uma proporção variada de outros tumores. Aproximadamente 85% dos cânceres anais, 50% dos cânceres da vulva, vagina e pênis, 20% do câncer orofaríngeo e 10% do câncer da laringe e do trato aerodigestivo também estão associados à infecção por esses vírus (Paavonen *et al.* 2000).

De acordo com dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer de colo do útero é o segundo mais comum entre mulheres no mundo sendo responsável, anualmente, por cerca de 470 mil casos novos e pelo óbito de, aproximadamente, 230 mil mulheres por ano. A incidência do câncer de colo de útero torna-se evidente na faixa etária de 20 a 29 anos e o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico geralmente na faixa etária de 45 a 49 anos. Cerca de 80% dos casos novos ocorrem em países em desenvolvimento onde, em algumas regiões, esse é o câncer mais comum entre as mulheres (INCA 2006). Para 2006, as estimativas do INCA sobre incidência previam 19260 novos casos de câncer de colo do útero, com um risco estimado de 20 casos a cada 100 mil mulheres. No Distrito Federal, para 2006, se estimou uma incidência de

22,63 novos casos de câncer de colo do útero para cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não-melanomas, o câncer do colo do útero é o mais incidente na região Norte (22/100.000). Nas regiões Sul (28/100.000), Centro-Oeste (21/100.000) e Nordeste (17/100.000) representa o segundo tumor mais incidente. Na região Sudeste é o terceiro mais freqüente (20/100.000) (INCA 2006).

A infecção genital pelo HPV é a doença sexualmente transmissível mais freqüente na população feminina sexualmente ativa. Calcula-se que, no Brasil, de 10 a 40% das mulheres que se incluem nesse perfil sofram dessa infecção. Apesar de menos de 1% das infectadas desenvolverem efetivamente o câncer de colo uterino, a doença representa, no Brasil, a terceira causa mais freqüente de câncer entre as mulheres, atrás apenas do câncer de pele não-melanoma e do câncer de mama (INCA 2006).

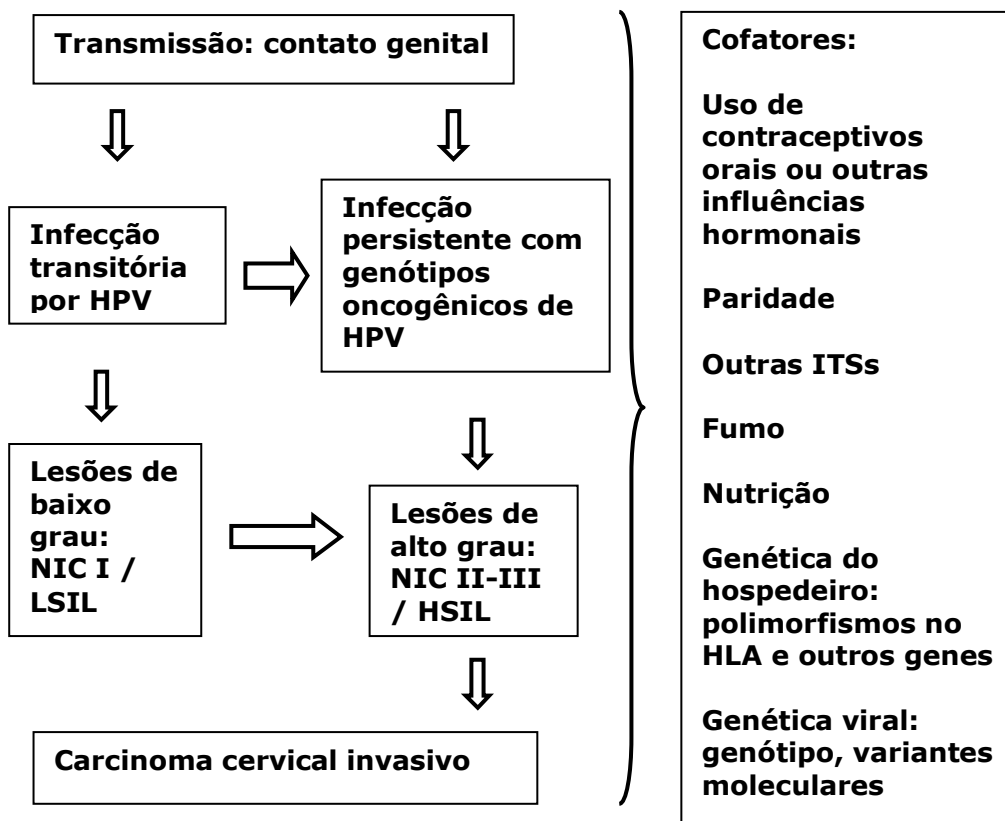
Em todo o mundo, uma em cada quatro mulheres está infectada pelo HPV, transmitido principalmente pelo sexo sem proteção. E o Brasil é um dos cinco países mais atingidos pelo vírus. A diferença é que, aqui, a detecção do HPV e das lesões pré-malignas é tardia, já que grande parte das brasileiras não tem acesso aos exames ginecológicos periódicos. Para se ter idéia da gravidade da situação, esse é o câncer que mais mata mulheres na região Norte, o segundo no Nordeste e o terceiro nas demais regiões (INCA 2006).

Estudos sobre a prevalência do HPV em diversas populações em todo o mundo têm mostrado uma grande variação nas taxas de positividade. Em geral, entretanto, a prevalência do HPV é maior em mulheres jovens, quando comparadas a mulheres com mais de 30 anos. A maioria das infecções por HPV em mulheres jovens resolve-se espontaneamente, mais freqüentemente em um período de 24 meses. Os resultados heterogêneos dos estudos epidemiológicos podem ser atribuídos a alguns fatores importantes. Primeiro, parece haver diferenças marcantes na prevalência do HPV em diferentes populações com relação à idade, freqüência de anormalidades citológicas e diversidade dos genótipos de HPV. Segundo, múltiplas técnicas de obtenção das amostras e de detecção do DNA do HPV têm sido usadas, com diferentes sensibilidades e especificidades, o que pode ter um impacto significativo nas taxas de detecção (Molijn *et al.* 2005).

Os determinantes do risco para infecção por HPV, identificados em diversos estudos transversais e de coorte, incluem o número de parceiros sexuais (ao longo da vida e recentes), idade da primeira relação sexual, fumo (Winkelstein 1977), uso de contraceptivos orais (Moreno *et al.* 2002), outras infecções transmitidas sexualmente

(ITSs) (ex: clamídia e vírus da herpes) (Smith *et al.* 2002; de Sanjose *et al.* 1994), inflamação crônica, condições imuno-supressivas, incluindo infecção por HIV, e paridade. No entanto, as associações desses fatores com o desenvolvimento de câncer cervical parecem não ser causais e sim circunstanciais, uma vez que aumentam a probabilidade de infecção por HPV (Figura 6) (Trottier & Franco 2006; Muñoz *et al.* 1994).

Mulheres com infecção persistente por genótipos oncogênicos de HPV apresentam maior probabilidade de desenvolver lesão persistente e/ou progressiva. Além disso, infecções persistentes associadas à alta carga viral são consideradas fatores de risco para a ocorrência de lesões cervicais persistentes (Xi *et al.* 2007; Ho *et al.* 1995). A progressão tumoral está sujeita, ainda, a fatores ambientais tais como carcinógenos químicos e físicos, ao uso de contraceptivos orais, hormônios e tabagismo (Figura 6) (Muñoz *et al.* 1994).



**Figura 6.** Modelo etiológico da infecção por papilomavírus humano (HPV) como causa necessária do câncer cervical e incorporando o papel de co-fatores do hospedeiro, reprodutivos, relacionados ao estilo de vida e virais. NIC: neoplasia intra-epitelial cervical; LSIL: lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau; HSIL: lesão intra-epitelial escamosa de alto grau; HLA: antígeno leucocitário humano; ITS: infecção transmitida sexualmente. Fonte: Trottier & Franco 2006, modificado.

Fatores genéticos também podem constituir um risco para o desenvolvimento de neoplasia. As moléculas de MHC de classe II, que apresentam peptídeos antigênicos às células T CD4+, parecem estar envolvidas na susceptibilidade genética ao desenvolvimento de câncer cervical (Maciag & Villa 1999). A resposta imunológica do hospedeiro também parece ser um fator importante no desenvolvimento de câncer cervical, uma vez que mulheres infectadas com HIV têm uma probabilidade, aproximadamente, quatro vezes maior de serem infectadas por HPV. Além disso, a infecção por HPV em mulheres co-infectadas com HIV tem maior probabilidade de se tornar persistente (Del Mistro & Bianchi 2001).

**Diagnóstico.** O longo intervalo entre a aquisição da infecção por HPV e o desenvolvimento do câncer de colo do útero permitiu a instituição de programas de triagem que utilizam o exame de Papanicolau (Pap). Esse exame reduz a incidência do câncer de colo do útero ao permitir a detecção e a excisão das neoplasias intraepiteliais cervicais – NICs ou do adenocarcinoma *in situ* – AIS antes do desenvolvimento do câncer invasivo. O Pap baseia-se na coloração de células epiteliais obtidas da cérvix, na expectativa de que anormalidades nucleares detectáveis (discarose) sejam representativas de lesões subjacentes definidas histologicamente. O resultado da citologia é a primeira informação de que o médico dispõe sobre a existência de uma possível enfermidade cervical. Além disso, esse monitoramento citológico cervical é considerado o programa de maior sucesso no controle do câncer até hoje, apesar de não ser isento de falhas. Por exemplo, a distribuição desigual de células neoplásicas em uma lesão pode levar a uma amostra não representativa, erros de preparação e coloração podem ocultar áreas de significado importante no diagnóstico, além do diagnóstico ser, necessariamente, subjetivo, com grande variabilidade interobservador (Cuschieri & Cubie 2005).

O teste Pap é um método morfológico de monitoramento para infecções virais e as conseqüentes lesões intraepiteliais. A colposcopia permite a visualização das lesões e a histopatologia permite que um diagnóstico definitivo seja feito. Técnicas de amplificação e hibridização de ácidos nucléicos são usadas desde 1980 para detecção, genotipagem e quantificação da carga viral. A citologia de fase líquida está relacionada a uma melhora na qualidade do material coletado e oferece a possibilidade de associação dos métodos citológicos e moleculares na mesma amostra (Pinto *et al.* 2005).

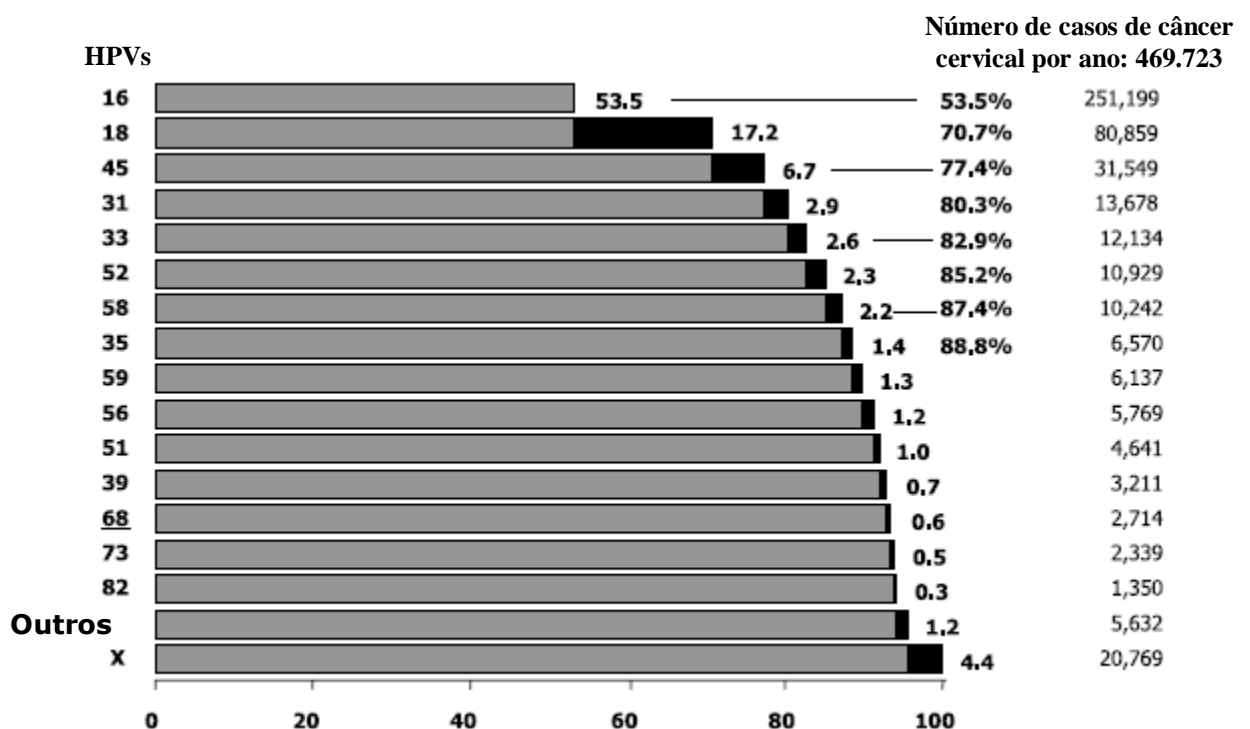
No Brasil, os laudos cervicais são classificados da seguinte forma: i) Dentro dos limites da normalidade, no material examinado; ii) Alterações celulares benignas; ou iii) Atipias celulares. Dentre as alterações celulares benignas, inclui-se inflamação, reparação, metaplasia escamosa imatura, atrofia com inflamação e radiação. As atipias celulares subdividem-se em: células atípicas de significado indeterminado (escamosas, glandulares ou de origem indefinida); em células escamosas: lesão intra-epitelial de baixo grau (compreendendo efeito citopático pelo HPV e neoplasia intra-epitelial cervical grau I), lesão intra-epitelial de alto grau (compreendendo neoplasias intra-epiteliais cervicais graus II e III), lesão intra-epitelial de alto grau (não podendo excluir microinvasão) e carcinoma epidermóide invasor; e em células glandulares: adenocarcinoma *in situ* e adenocarcinoma invasor (cervical ou endometrial) (INCA 2006).

**Genótipos, subtipos e variantes de HPV.** Em estudo recente sobre a distribuição mundial dos genótipos de HPV, foi demonstrado que o HPV-16 é o mais comum no mundo todo. Esse genótipo foi, pelo menos, duas vezes mais freqüente que qualquer outro genótipo de alto risco em todas as regiões, com exceção da África sub-Saariana, onde o HPV-35 foi igualmente comum. A proporção de todas as infecções por HPV-16 foi 26% na Europa e 12%, 18% e 21% na África, Ásia e América do Sul, respectivamente. Em seguida, os genótipos de HPV mais comuns no mundo entre mulheres citologicamente normais foram -42, -58, -31 e -18, com diferenças significativas entre as regiões. O segundo genótipo de HPV mais comum foi -33 na Ásia, -58 na América do Sul e -31 na Europa. Essa heterogeneidade na distribuição mundial dos genótipos do HPV tem implicações no desenvolvimento e no impacto de testes de diagnóstico e de vacinas (Ihekweazu 2006; Clifford *et al.* 2005).

Estudo epidemiológico sobre a prevalência do HPV no câncer cervical revelou que, dentre os mais de 35 genótipos de HPV encontrados no trato genital, o HPV-16 é responsável por 50 a 60% de todos os casos desse tipo de câncer na maioria dos países, seguido pelo HPV-18 (10 a 20%), HPV-45 (4 a 8%) e HPV-31 (1 a 5%). A figura 7 mostra a distribuição cumulativa de 15 genótipos de HPV entre cerca de 3000 casos de câncer cervical. Dentre eles, os cinco genótipos mais comuns de HPV foram 16, 18, 45, 31 e 33, encontrados em 80% dos carcinomas de células escamosas e em 94% dos adenocarcinomas (Bosch *et al.* 2006).

As freqüências de detecção dos HPVs nas lesões cervicais podem refletir o potencial de um determinado HPV em induzir diferentes graus de NIC (Nicol *et al.*

2005). Os genótipos 6, 11 e 42 do HPV estão associados, principalmente, a verrugas genitais benignas e NIC de baixo grau, enquanto outros genótipos, como 16, 18 e, menos freqüentemente, 31, 33 e 35, foram identificados como agentes infecciosos causadores da maioria dos casos de câncer cervical e suas lesões precursoras de alto grau. A relação entre os genótipos de HPV e os diferentes graus de lesões cervicais foi relatada por Matsukura & Sugase (2001), que observaram que a maioria dos HPVs genitais tem o potencial de induzir NIC I e demonstraram, também, uma forte relação entre o HPV-16 e a indução de NIC III, seguido pelos HPVs 58, 52 e 31. O HPV-18, um genótipo genital de alto risco, estava presente em NIC de alto e baixo graus.



**Figura 7.** Genótipos de HPV no câncer cervical em todas as regiões do mundo. Adaptado de Bosch *et al.* 2006.

Há indicações de que variantes do mesmo genótipo de HPV diferem biologicamente e etiologicamente. Tais diferenças podem contribuir para as disparidades na incidência de câncer cervical em todo o mundo (Xi *et al.* 2007; Bernard 2005). Os genótipos diferentes de HPV têm potencial oncogênico distinto e, da mesma forma, os variantes intragenótipo também apresentam oncogenicidade diferencial. Variantes de um mesmo genótipo de HPV também parecem apresentar diferenças quanto ao risco de progressão das lesões e quanto à imunogenicidade. Assim, esses



variantes intragenótipo do HPV, principalmente dos HPVs 16 e 18, são bastante estudados (Wu *et al.* 2006; de Boer *et al.* 2005; de Boer *et al.* 2004; Xi *et al.* 1997).

Pequenas diferenças na seqüência de nucleotídeos, encontradas entre os variantes de um genótipo, podem corresponder a mudanças nos aminoácidos codificados, levando a potenciais de infecção distintos entre os diferentes variantes (Bernard 2002). Mutações na seqüência de nucleotídeos da LCR podem resultar na perda da capacidade de ligação de um fator transcricional específico (Dong *et al.* 1994), na mudança do seu sítio de reconhecimento, aumentando ou diminuindo a afinidade do fator, ou, ainda, na alteração de sua habilidade em interagir com outras proteínas (Schmidt *et al.* 2001). A mudança de um único nucleotídeo nesta região pode influenciar a replicação e a transcrição viral, por meio de sua influência na formação de complexos de proteínas regulatórias do DNA (Kämmer *et al.* 2002). Na proteína L1, uma ou mais alterações de aminoácidos poderia representar uma mudança conformacional na proteína do capsídeo e, assim, poderia afetar, também, a conformação de epitopos relevantes para neutralização viral (Sichero & Villa 2006) (Tabela 1).

Diferentes estudos estão sendo conduzidos em todo o mundo para analisar qualquer possível associação entre um maior risco de infecção persistente e/ou desenvolvimento de lesões cervicais e variantes específicos dos HPVs 16 e 18. Estudos conduzidos na América do Norte revelaram que variantes não-Europeus do HPV-16 estão associados a um maior risco de lesão intra-epitelial cervical e carcinoma *in situ*, com relação ao risco associado aos variantes Europeus. Em outro estudo realizado em São Paulo, os variantes não-Europeus dos HPVs 16 e 18 também estavam epidemiologicamente associados a um maior risco de infecção persistente e desenvolvimento de lesão cervical. Além disso, em estudos de caso-controle envolvendo pessoas da Costa Rica e México, uma maior prevalência de variantes Asiático-Americanos foi observada em amostras isoladas de câncer cervical quando comparadas às amostras normais. A variabilidade intratípica entre amostras da América do Norte e do México positivas para HPV-18 sugeriu uma associação entre variantes específicos e a histopatologia. Variantes não-Europeus dos HPVs 16 e 18 são comumente detectados em adenocarcinomas. Uma associação entre variantes específicos dos HPVs 33, 35, 52 e 58 com a persistência da infecção e com a severidade da neoplasia também foi observada (Sichero & Villa 2006).

**Tabela 1.** Implicações funcionais da variabilidade gênica do HPV (adaptado de Slichero & Villa 2006).

<b>Região variável</b>	<b>Implicações funcionais</b>
<b>LCR</b>	Mudança na afinidade de ligação de diferentes fatores celulares de transcrição Criação ou eliminação de sítios de ligação de fatores transcricionais Mudança na atividade transcricional
<b>E6</b>	Maior ativação da telomerase Mudança na ligação e degradação de proteínas celulares Mudança na ativação de vias celulares Geração e manutenção do fenótipo transformado Monitoramento imune do hospedeiro
<b>E7</b>	Mudança na ligação a proteínas celulares Mudança na ativação de vias celulares Geração e manutenção do fenótipo transformado
<b>E5</b>	Mudança na atividade de transformação
<b>L1</b>	Alteração de epitopos de L1 dependentes de conformação e que são relevantes para neutralização viral
<b>E2</b>	Mudança na atividade transcricional Maior tendência de integração Maior eficiência na replicação

Vacinas contra o HPV estão em desenvolvimento. Não está clara a extensão em que ocorre reatividade cruzada na resposta imune entre variantes intragenótipo do HPV, mas o conhecimento sobre eles pode ser importante para o desenvolvimento de vacinas. Além disso, ao desenvolver iniciadores ou sondas em métodos de detecção do HPV ou em pesquisa, deve-se levar a distribuição dos variantes em consideração (de Boer *et al.* 2004).

O conhecimento sobre o genoma do HPV permitiu o desenvolvimento de duas vacinas profiláticas capazes de proteger contra infecção persistente por HPV e NIC com 100% de eficácia em mulheres que completaram o esquema de vacinação. Essas vacinas são bastante imunogênicas e seguras. As vacinas contra HPV prometem contribuir muito na assistência à saúde e na prevenção do câncer. Entretanto, algumas questões ainda estão em discussão, como a população alvo, a duração da proteção, o custo, a aceitação pública e o potencial para distribuição mundial (Speck & Tyring 2006).

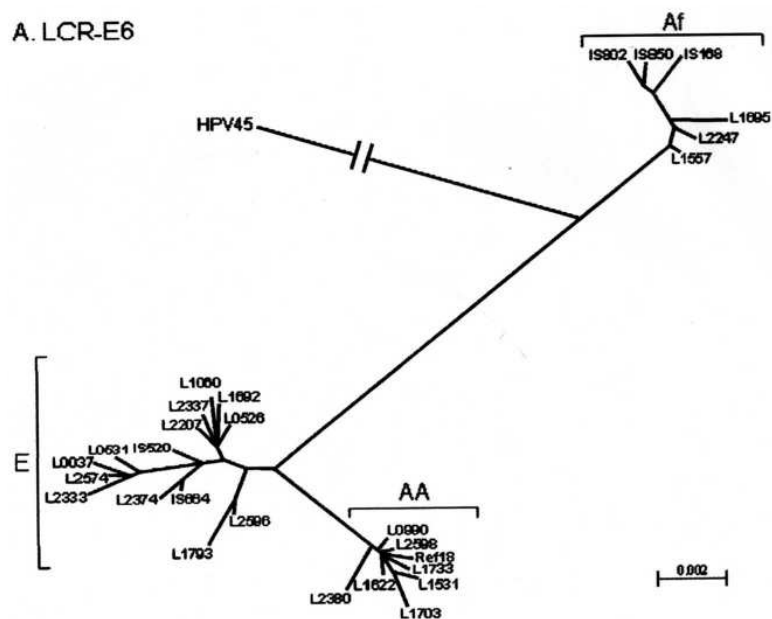
A Vacina Quadrivalente Recombinante contra os HPVs 6, 11, 16 e 18, fabricada pelo laboratório Merck Sharp & Dhome e já aprovada para comercialização

por diversas Autoridades Regulatórias mundiais, inclusive no Brasil, pode prevenir infecções por esses quatro genótipos de HPV. Dessa forma, a vacina tem potencial de evitar 70% dos casos de câncer de colo de útero e 90% dos casos de verrugas genitais, visto que os HPVs 16 e 18 são responsáveis por 70% dos casos de câncer de colo de útero e os HPVs 6 e 11 respondem por 90% das verrugas genitais (Villa *et al.* 2005). Por outro lado, a Vacina Bivalente Recombinante contra os HPVs 16 e 18, desenvolvida pela empresa GlaxoSmithKline, age contra os genótipos 16 e 18 e ainda está em fase de análise pelas autoridades sanitárias (Harper *et al.* 2004). As vacinas profiláticas devem ser utilizadas em meninas com mais de 9 anos de idade e antes do início da atividade sexual.

No entanto, a eficácia das vacinas pode ser limitada pelo fato de que os vírus que são controlados eficientemente por anticorpos neutralizantes podem sofrer mutações e dar origem a linhagens que não sejam reconhecidas pelos anticorpos produzidos após infecção por outras linhagens. Diversos variantes de HPV foram isolados a partir de diferentes localizações geográficas. Trocas de aminoácidos observadas no gene L1 e localizadas perto de epitopos neutralizantes sugerem que os variantes podem evoluir no sentido de escapar da neutralização pelo sistema imune do hospedeiro. Assim, mutações pontuais poderiam afetar seriamente a eficácia das vacinas contra HPV, sendo importante determinar os efeitos das mutações sobre a neutralização viral (Varsani *et al.* 2006). Apesar da importância de se considerar os variantes de HPV no desenvolvimento de vacinas, alguns estudos demonstram que, após a vacinação, há indução de anticorpos com atividade neutralizante entre diferentes espécies de papilomavírus humanos (Gambhira *et al.* 2006; Harper *et al.* 2006).

**Os HPVs 16 e 18.** Os HPVs de alto risco mais comumente ligados ao câncer anogenital são o 16 e o 18. Esses vírus também estão relacionados ao carcinoma orofaríngeo (Beniston & Campo 2005; Pater & Pater 1985). Os HPVs 16 e 18 são responsáveis por dois terços de todos os carcinomas cervicais no mundo. Estima-se que o HPV-16 seja responsável por cerca de 60% dos cânceres cervicais, com o HPV-18 contribuindo com 10-20% (Mahdavi & Monk 2005). O HPV-18 tem sido associado a uma forma mais agressiva de NIC e de carcinoma cervical invasivo, além de a uma maior taxa de integração do genoma e maior probabilidade de recorrência de câncer e de metástase de nódulos linfáticos (Arias-Pulido *et al.* 2005; Schwartz *et al.* 2001; Arends *et al.* 1993). Por outro lado, alguns estudos não encontraram essas associações (Arias-Pulido *et al.* 2005; King *et al.* 1989).

Por meio da análise dos padrões de mutações, foi observado que diferentes variantes dos HPVs 16 e 18 co-evoluíram com os três maiores ramos filogenéticos humanos (africanos, caucasianos e asiáticos). Os variantes do HPV-16 foram agrupados em cinco clados distintos, distribuídos em diferentes regiões geográficas: Europeu (E), Asiático (As), Asiático–Americano (AA), Africano 1 (Af-1) e Africano 2 (Af-2) (Ho *et al.* 1993; Chan *et al.* 1992). A árvore filogenética de isolados do HPV-18 revela os ramos Africano (Af), Europeu (E) e Asiático Americano (AA), sendo que este último contém o protótipo (Figura 8) (Bernard *et al.* 2005; Ong *et al.* 1993; Cole & Danos 1987).



**Figura 8.** Árvore filogenética do HPV-18, incluindo variantes representativas das linhagens Asiático-Americana (AA), Européia (E) e Africana (Af) encontrados a partir da análise das regiões LCR-E6. Fonte: Arias-Pulido *et al.* 2005.

Assim como os genótipos de HPV, também foi descrito que os variantes intragenótipo diferem no seu potencial oncogênico. Foi sugerida uma associação entre variantes não-europeus (não-E) do HPV-16 e do HPV-18 e um maior risco de lesões cervicais, visto que esses variantes parecem estar mais fortemente associados com o risco de prevalência e incidência de lesões de alto grau do que os Europeus (Sichero *et al.* 2005). No Brasil, foi demonstrado que os variantes não-europeus do HPV-18 estavam associados a maior persistência e a lesões de alto grau, quando comparados aos variantes europeus. No entanto, mais pesquisas são necessárias para avaliar o potencial

oncogênico de variantes do HPV-18 (de Boer *et al.* 2005; Kämmer *et al.* 2000; Villa *et al.* 2000; Veress *et al.* 1999).

A oncogenicidade de variantes moleculares parece diferir não apenas por região geográfica, mas também em função da origem étnica da população. Estudos conduzidos em populações mistas, tais como as do Brasil, Costa Rica, México e Estados Unidos, confirmam a associação entre variantes não-europeus dos HPVs 16 e 18 e o risco de infecção persistente e de lesões cervicais. Entretanto, em populações de diferentes partes da Europa, nas quais a maioria dos variantes detectados é europeia, nenhuma diferença no potencial oncogênico entre variantes de diferentes ramos filogenéticos foi observada. Esses resultados podem ter implicações no monitoramento do risco de lesões cervicais em diferentes regiões geográficas (de Boer *et al.* 2005; Sichero *et al.* 2005).

A observação mais consistente é de uma maior prevalência de variantes não-E do HPV-16 em câncer cervical e lesões cervicais de alto grau do que seria esperado com base na sua prevalência relativa em tecidos normais. Estudos recentes sugerem que há uma associação 2 a 3 vezes mais forte de variantes não-E com lesões cervicais de alto grau do que o encontrado para variantes E do HPV-16. Há menos estudos sobre variantes do HPV-18, mas os dados limitados sugerem que, como para o HPV-16, os variantes não-E do HPV-18 podem ser mais comuns que o esperado em amostras cervicais e em lesões de alto grau. A linhagem AA do HPV-18, como o protótipo está classificado, representa variantes de alto risco, enquanto a linhagem Africana representa variantes de baixo risco. É importante enfatizar que a classificação histórica dos protótipos nas linhagens E do HPV-16 e AA do HPV-18 foi baseada na cronologia do isolamento viral e não no conhecimento sobre o risco de doença ou propriedades biológicas (Xi *et al.* 2007; Schlecht *et al.* 2005).

Uma possível explicação para essa oncogenicidade diferencial está na observação de que variantes naturais do HPV possuem certas propriedades biológicas e bioquímicas alteradas. Isso tem sido evidenciado pelas mudanças na capacidade de suprimir respostas de diferenciação dos queratinócitos, em induzir a degradação de p53, na montagem viral, no reconhecimento imunológico pelo hospedeiro e na atividade de imortalização (Sathish *et al.* 2005).

Entretanto, ainda sabe-se pouco sobre a história natural de variantes dos HPVs 16 e 18 para explicar a possível diferença na sua associação ao câncer cervical. Essas diferenças podem envolver eventos precoces ao longo do processo da tumorigênese

cervical, como diferenças na persistência viral e no risco de desenvolver lesões cervicais. Alternativamente, diferenças no risco de câncer entre variantes dos HPV 16 e 18 podem estar relacionadas a eventos tardios, como o risco de transição de lesões de alto grau ao câncer. Adicionalmente, variantes altamente oncogênicos dos HPV 16 e 18 podem ter uma história natural particularmente agressiva na presença de um sistema imune debilitado no hospedeiro, como em mulheres HIV-positivas. Assim, as mulheres infectadas pelo HIV representam uma oportunidade única para o estudo dos efeitos do quadro imune do hospedeiro quanto ao tipo e comportamento do variante. Até o presente, há apenas pequenos estudos em mulheres HIV-positivas. Esses estudos relatam resultados conflitantes com relação aos efeitos da co-infecção com HIV sobre a distribuição dos variantes do HPV (Schlecht *et al.* 2005; Chaturvedi *et al.* 2004).

**A co-infecção HIV – HPV.** O HPV representa uma das infecções oportunistas que mais acomete as mulheres portadoras do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1). Estudos epidemiológicos sugerem que cerca de 45% da população feminina contaminada pelo HIV apresenta lesões características da infecção por HPV (Clarke & Chetty 2002).

A interação HIV-HPV é particularmente importante visto que, como os dois vírus são transmitidos sexualmente, o estabelecimento de contato entre populações de alto risco torna a co-infecção comum. Estudos de caso-controle mostram que a infecção por HIV é um fator de risco independente para HPV, tanto na sua forma latente quanto na clínica. Esses dados reforçam a necessidade de acompanhamento ginecológico regular das pacientes HIV-positivas para assegurar o diagnóstico precoce de lesões pré-invasivas e para a prevenção do câncer cervical (Pinto *et al.* 2005).

Em 1993, o câncer de colo uterino foi a neoplasia mais freqüente entre mulheres com AIDS. Desde então, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças nos Estados Unidos (*Center for Disease Control and Prevention* - CDC) declarou que o carcinoma cervical invasivo (CCI) enquadra-se na lista de doenças definidoras da AIDS em mulheres infectadas pelo HIV (Sirera *et al.* 2006; Ferenczy *et al.* 2003; Clarke & Chetty 2002; Sanjosé & Palefsky 2002). Desde então, estima-se, na Europa ocidental, um percentual de 2,3% de mulheres com AIDS e que possuem CCI como uma doença associada. Essa proporção pode ser ainda maior nos países em desenvolvimento (Sanjosé & Palefsky 2002). Diferente de outras neoplasias associadas à AIDS, a ocorrência de câncer cervical é independente da supressão imune. A infecção pelo HIV-1 em pacientes com lesões pré-cancerosas de alto grau e câncer cervical invasivo resulta

em refração da terapia e em um fenótipo mais agressivo da doença, que ainda não é bem entendido molecularmente.

A infecção pelo HIV pode acelerar a progressão das lesões associadas ao HPV. Essas lesões associadas ao HPV comprometem a mucosa do colo uterino e podem progredir para lesões de alto grau. Em geral, o câncer cervical invasivo demora cerca de dez anos para se desenvolver em mulheres infectadas apenas com o HPV. Entretanto, no caso das mulheres co-infectadas por HIV e HPV, esse período pode ser de um ou dois anos. Além disso, a replicação do HPV pode ser mais eficiente em um hospedeiro imunodeficiente, o que resultaria em uma maior taxa de detecção e em maior probabilidade de desenvolvimento de uma infecção persistente pelo HPV. Outro fator que pode explicar a associação entre HIV e HPV é a via comum de transmissão, ou seja, sexual. Dessa forma, o portador do HIV tem maior risco de contaminar-se com outro patógeno de transmissão sexual, como o HPV, que é a ITS mais freqüente em todo o mundo (Volkow *et al.* 2001). Nos portadores do HIV com comprometimento imunológico, é mais provável que o HPV produza lesões, aumentando a chance de detecção clínica da infecção (Levi *et al.* 2002a; Sanjosé & Palefsky 2002).

Outro aspecto importante da associação com o HIV é o risco aumentado de infecção por múltiplos genótipos do HPV. Nos Estados Unidos, Palefsky *et al.* (1999) observaram uma prevalência de DNA do HPV em 63% das mulheres infectadas por HIV incluídas no estudo. Dessas, 36% estavam infectadas por múltiplos genótipos de HPV, enquanto no grupo de mulheres HIV negativas 12% estavam infectadas por mais de um genótipo viral. No Brasil, Gonçalves *et al.* (1999) estudaram pacientes HIV positivas e observaram que 80,8% delas eram HPV positivas e que 45% estavam infectadas por múltiplos genótipos de HPV. Entretanto, é relatado na literatura que existem diferenças significativas no espectro e na prevalência dos genótipos e variantes de HPV em mulheres de diferentes regiões geográficas (Câmara *et al.* 2003; Levi *et al.* 2002b).

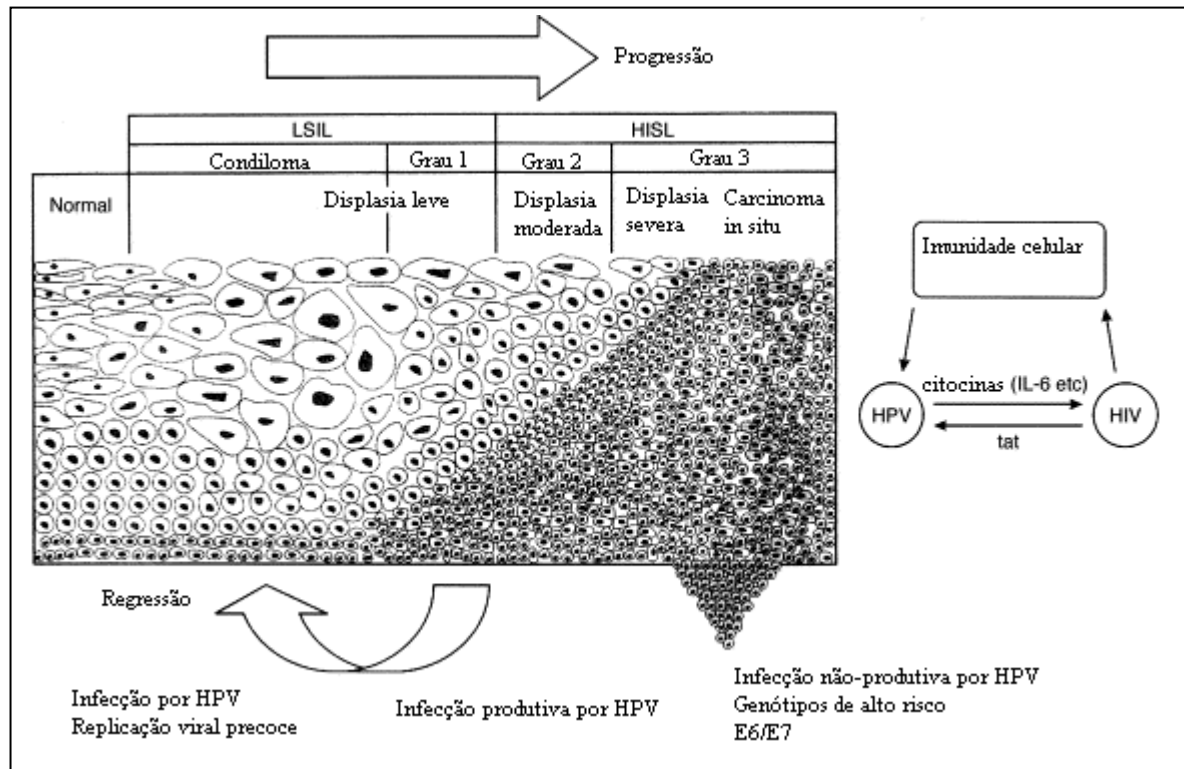
As mulheres imunodeprimidas, com resultado citológico alterado, têm risco aumentado de apresentar lesão histopatológica mais grave, ou progressão da lesão, incluindo a evolução para o câncer do colo do útero. Nas mulheres portadoras do HIV, as lesões precursoras apresentam envolvimento cervical mais extenso e com mais freqüência envolvem outros órgãos do trato genital inferior, tais como a vagina, a vulva e a região perianal. A investigação da paciente com citologia sugestiva de lesões de baixo e alto graus e o respectivo tratamento devem ser acompanhados de introdução de

terapia anti-retroviral eficaz. Isso reduz o risco de recorrências, de progressão de lesões existentes e de persistência pós-tratamento (INCA 2006).

Ainda não está claro se a interação HIV-HPV está relacionada direta ou indiretamente à imunossupressão causada pelo HIV. A co-infecção não ocorre na cérvix; entretanto, podem ocorrer interações moleculares entre os dois vírus. Essas interações são, provavelmente, causadas por fatores extracelulares. A proteína de transativação do HIV-1 (Tat) é capaz de influenciar a progressão do ciclo celular, estando associada a uma redução significativa na expressão de inibidores da transcrição no ciclo celular e a um aumento nos níveis de marcadores de proliferação. Esses dados sugerem que o HIV-1 pode estimular a carcinogênese cervical por promover a progressão do ciclo celular. O aumento na expressão gênica do HPV nas mulheres HIV-positivas pode, portanto, ser provocado por interações envolvendo a proteína Tat e proteínas precoces do HPV (Pinto *et al.* 2005). Mesmo em nível celular, uma interação direta entre HIV e HPV pode ocorrer. Apesar de o HPV infectar o epitélio, o HIV pode ser encontrado em células de Langerhans, células do estroma e células T infiltrantes. Foi também demonstrado que a proteína Tat do HIV-1 pode transativar *in vitro* E6 e E7, provocando uma maior expressão dessas oncoproteínas. A secreção anormal de citocinas pelos linfócitos infectados pelo HIV pode, também, facilitar o aumento da neoplasia (Figura 9). Entretanto, o papel do HIV-1 nos carcinomas cervicais ainda não está claro (Nyagol *et al.* 2006).

**Aspectos imunológicos da co-infecção HIV – HPV.** Existe uma clara associação entre a infecção pelo HIV e o aumento da frequência, persistência e patogenicidade do HPV. Evidências indicam que a imunossupressão associada à infecção pelo HIV aumenta a susceptibilidade à infecção pelo HPV, alterando também o curso de infecções pré-existentes (Palefsky 2006; Volkow *et al.* 2001). Vários estudos corroboram a possibilidade de o HIV influenciar a expressão do HPV diretamente, através de interações moleculares entre genes virais, ou indiretamente, devido à imunossupressão. Tem sido sugerido que partes do genoma do HIV podem estimular a expressão de genes do HPV. Outros estudos mostram que a diminuição das células apresentadoras de antígenos, as células de Langerhans, em portadoras do HIV, pode comprometer a imunidade celular contra o HPV (Clarke & Chetty 2002) e que mulheres co-infectadas por HIV e HPV apresentam uma redução significativa nos níveis de citocinas no sangue periférico, importantes fatores mediadores da resposta imune (Ferenczy *et al.* 2003).





**Figura 9.** Representação esquemática da oncogênese associada ao HPV e as possíveis interações entre HPV e HIV nas lesões associadas. A consequência clínica de uma infecção por HPV é influenciada por fatores virais e do hospedeiro; a infecção persistente por HPVs de alto risco e o sistema imune debilitado estão associados a um maior risco de progressão da lesão. O HIV aumenta a taxa de infecção, persistência e progressão do HPV, indiretamente por reduzir a imunidade celular local e sistêmica e, talvez, diretamente por aumentar a expressão de genes precoces do HPV através de Tat. Por outro lado, células infectadas por HPV podem ser capazes de ativar a replicação do HIV devido à produção de citocinas, tal como interleucina-6 (IL-6). LSIL: lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau; HSIL: lesão intra-epitelial escamosa de alto grau. Adaptado de Del Mistro & Bianchi 2001.

Vários estudos indicam que as mulheres infectadas pelo HIV têm uma chance 2 a 3 vezes maior de apresentar níveis detectáveis de DNA do HPV nas secreções cervico-vaginais, sendo mais comuns os tipos 16, 18 e infecções com mais de um genótipo de HPV, quando comparadas às mulheres não infectadas pelo HIV. A prevalência da infecção pelo HPV parece aumentar à medida que ocorre a progressão do dano imunológico associado à infecção pelo HIV ([http://www.iqb.com.br/Mulher\\_hiv](http://www.iqb.com.br/Mulher_hiv)). As respostas imunes locais podem estar alteradas nas mulheres co-infectadas. Níveis baixos de células T CD4 estão associados com a expressão de múltiplos genótipos de HPV e com uma prevalência aumentada de genótipos oncogênicos. O grau de imunodeficiência pode influenciar a persistência, recorrência e/ou progressão da neoplasia cervical induzida pelo HPV (Volkow *et al.* 2001).

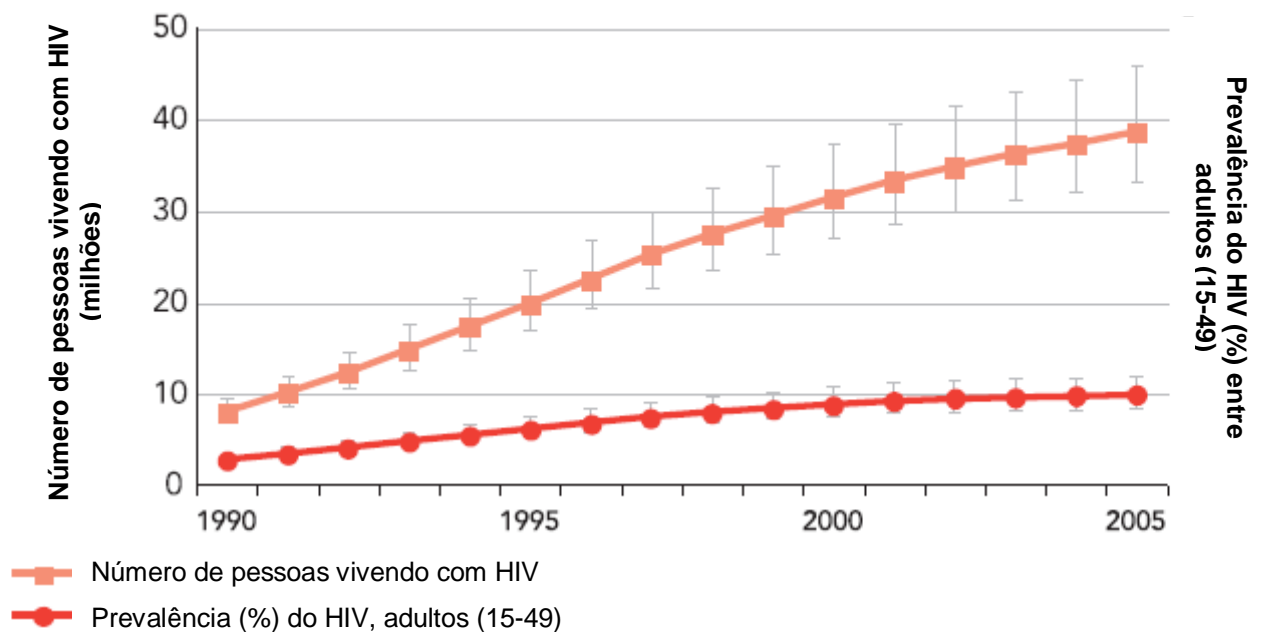
A resposta imune mediada por célula tem um papel importante em controlar as neoplasias associadas ao HPV. As lesões relacionadas ao HPV são, normalmente,

transitórias e, presumidamente, regridem como resultado de uma resposta imune celular. O HPV passa por um período de latência clínica, mas, frequentemente, reaparece, especialmente em mulheres infectadas pelo HIV. As lesões pré-malignas podem, ainda, regredir espontaneamente, e, quando ocorre progressão para tumores cervicais, observa-se um infiltrado celular formado por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, monócitos, macrófagos e granulócitos. Há evidências claras de que a co-infecção HPV/HIV pode influenciar a progressão da AIDS por dois mecanismos potenciais: (1) pelo recrutamento de células-alvo do HIV, tais como células T CD4<sup>+</sup> e macrófagos, para o sítio de infecção ativa pelo HPV e (2) por induzir a produção de citocinas inflamatórias, incluindo IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Essas citocinas inflamatórias podem induzir a replicação e transcrição reversa do HIV (Figura 9) (Nicol *et al.* 2005).

## JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Os índices elevados de incidência e mortalidade por câncer do colo do útero no Brasil justificam a implementação de ações nacionais voltadas para a prevenção e o controle do câncer (promoção, prevenção, diagnóstico, tratamento, reabilitação e cuidados paliativos) (INCA 2006).

Considerando a incidência crescente das infecções por HIV-1 e dos casos de AIDS no Brasil e no mundo, principalmente entre mulheres (Figura 10) (Levi *et al.* 2002b), a pesquisa do HPV nessa população é de grande importância para o conhecimento dos aspectos envolvidos na co-infecção HIV-HPV e para a adoção de medidas efetivas no tratamento da AIDS pelas autoridades em saúde pública. Esse grupo de mulheres apresenta maior probabilidade de infecção por genótipos de HPV de alto risco oncogênico, infecção por múltiplos genótipos e manifestação dos efeitos da infecção pelo HPV mais precoce e intensamente (Ferenczy *et al.* 2003; Levi *et al.* 2002b). A exposição à infecção pelo HIV pode aumentar a taxa de persistência do HPV e de lesões escamosas intraepiteliais cervicais, provavelmente devido ao comprometimento da resposta imune (Sanjosé & Palefsky 2002; Ahdieh *et al.* 2001).



**Figura 10.** Estimativa do número de pessoas vivendo com HIV e da prevalência da infecção (%) entre a população mundial adulta, 1990-2005. Adaptado de “2006 Report on the Global AIDS Epidemic”, UNAIDS.

O estudo da variabilidade dos HPVs pode fornecer informações relevantes sobre o polimorfismo intragenótipo, que pode ter efeito sobre a patogenicidade viral e a resposta imune do hospedeiro, contribuindo para o desenvolvimento de vacinas adequadas. Esse estudo é particularmente importante para o HPV-18, que representa um genótipo de alto risco associado a cerca de 15% dos casos de câncer cervical e para o qual ainda não existem dados na região central do Brasil. Além disso, a inclusão do HPV-18 nas vacinas contra HPV reforça a necessidade de conhecimento de sua variabilidade genética em cada região geográfica.

Existe, atualmente, um interesse crescente no desenvolvimento de vacinas contra os HPVs. O conhecimento da prevalência dos genótipos de HPV em populações não portadoras e portadoras de outras ITSs é fundamental na escolha dos genótipos de HPV que serão incluídos nas vacinas, determinando a eficácia das mesmas (Yamada *et al.* 1997).

Em um estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa, na Universidade de Brasília, a genotipagem dos HPVs por meio da amplificação do gene L1 com iniciadores degenerados e análise por RFLP mostrou-se um método sensível e específico para identificação e caracterização do HPV em amostras clínicas (Câmara *et al.* 2003; Câmara *et al.* 2001). Além disso, a associação da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) com o seqüenciamento automático permitiu a identificação de novos variantes de HPV (Alencar *et al.* 2007; Veras *et al.* 2005; Cerqueira *et al.* 2003).

No estudo acima mencionado, foi realizada a caracterização molecular do HPV em mulheres HIV negativas com lesões cervicais sugestivas de infecção por HPV. Os resultados mostraram que a prevalência de genótipos pode variar bastante entre diferentes regiões geográficas. Nesse estudo, o HPV-16 foi o mais prevalente (43,8%), seguido pelo HPV-58 (12,5%). Esses dados do Distrito Federal diferem de alguns estudos anteriores realizados nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, e estão mais de acordo com o perfil de genótipos do HPV que ocorre nas regiões Norte e Nordeste (Câmara *et al.* 2003a; Lorenzato *et al.* 2000; Noronha *et al.* 1999).

No Distrito Federal, não há dados sobre a prevalência e a variabilidade do HPV em amostras de mulheres co-infectadas pelo HIV-1. Com vistas a ampliar o conhecimento sobre a variabilidade do HPV nesse grupo específico de indivíduos e a compreender melhor a interação entre HPV e HIV na co-infecção, os objetivos deste estudo foram:

- **Determinar a prevalência da infecção por HPV em mulheres infectadas pelo HIV-1 (população estudada);**
- **Determinar a frequência dos genótipos de HPV nessa população de mulheres HIV-1 positivas;**
- **Caracterizar os variantes de HPV que apresentaram padrões atípicos no RFLP;**
- **Caracterizar os variantes de HPV do genótipo 18, de alto risco;**
- **Realizar a análise filogenética dos variantes do HPV-18;**
- **Determinar a prevalência e os tipos de lesões associadas à infecção por HPV em amostras de mulheres co-infectadas com HIV-1;**
- **Estabelecer correlações entre os marcadores da infecção pelo HIV, especificamente a contagem de linfócitos T CD4 e a carga viral, com a presença de infecção por HPV e o tipo de lesão cervical associada;**
- **Determinar a relação entre o tratamento anti-retroviral, a presença de infecção por HPV e o tipo de lesão cervical associada ao HPV na população em estudo;**
- **Fornecer subsídios quanto à variabilidade dos genótipos e variantes do HPV para futuros testes de vacinas.**

## METODOLOGIA

**População de estudo.** A população alvo do estudo foi constituída de mulheres, com sorologia reagente para HIV-1, e residentes no Distrito Federal e Entorno, incluindo as Regiões Administrativas de Brasília, Gama, Taguatinga, Brazlândia, Sobradinho, Planaltina, Paranoá, Núcleo Bandeirante, Ceilândia, Guará, Cruzeiro, Samambaia, Santa Maria, São Sebastião, Recanto das Emas, Lago Sul, Riacho Fundo, Candangolândia, Águas Claras, Sudoeste/Octogonal, Varjão e Park Way. Algumas mulheres incluídas nesse estudo e atendidas na rede de saúde do DF eram residentes em municípios do Estado de Goiás localizados nos arredores do DF.

Foram considerados os seguintes critérios de inclusão: a) assinatura do consentimento livre e esclarecido, conforme as normas de pesquisa envolvendo seres humanos; b) idade superior a 13 anos; c) disponibilidade dos dados referentes à infecção por HIV-1 (carga viral e contagem de linfócitos T CD4); d) disponibilidade de dados referentes ao laudo citopatológico cervical; e) disponibilidade de dados relativos ao tratamento anti-retroviral.

A amostragem de indivíduos incluídos no estudo foi de 200 mulheres. Esse número de amostras foi definido utilizando-se o programa Statcalc Epi-6 (CDC), para um nível de confiança de 99,9%, de acordo com o quantitativo da população feminina HIV-positiva do DF.

O estudo ora apresentado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde do Governo do Distrito Federal.

**Coleta de dados.** Foi utilizado um questionário estruturado para coleta dos seguintes dados: idade, resultado do teste de carga viral do HIV, resultado do teste de contagem de células T CD4, tratamento anti-retroviral realizado no momento da coleta e laudo citopatológico cervical. Os testes para determinação da contagem de células T CD4 e da carga viral do HIV foram realizados pelo Laboratório de Saúde Pública do Distrito Federal – LACEN/DF. A técnica de b-DNA, kit HIV 3,0 RNA foi utilizada para quantificação da carga viral do HIV (limite inferior de detecção: 50 cópias de RNA/mL; limite superior de detecção: 500000 cópias de RNA/mL). Os dados assim obtidos foram utilizados para a execução dos objetivos desse projeto, sendo importante salientar que a privacidade das pacientes incluídas foi garantida, de forma que o nome de cada uma não foi vinculado às demais informações. Para tanto, todas as amostras foram previamente

codificadas e, através desses códigos, identificamos os dados acima mencionados, não tendo sido feita nenhuma identificação de pacientes por nome.

**Coleta e processamento das amostras.** As coletas foram realizadas no período de junho de 2004 a dezembro de 2006, principalmente, na Unidade Mista de Saúde do Distrito Federal, que atende e acompanha o tratamento dos portadores de HIV. Pacientes de outros estabelecimentos constituintes do Serviço de Saúde do DF, a saber, Hospital Universitário de Brasília (HUB), Hospital Regional de Sobradinho e consultório particular, também foram incluídas neste estudo. O procedimento de coleta de um raspado de células do colo do útero foi realizado pelo médico que atendeu à paciente no referido serviço de saúde. Para tanto, durante o período acima mencionado, as coletas foram realizadas no dia da semana específico destinado ao atendimento de mulheres soropositivas para HIV-1 (5ª feira no caso da Unidade Mista de Saúde do DF). Nesse dia, todas as mulheres que fossem atendidas pela médica ginecologista no respectivo serviço de saúde eram questionadas quanto ao interesse em participar da pesquisa. As pacientes que concordaram e, portanto, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, foram incluídas no estudo, havendo coleta de amostra cervical nesse mesmo dia.

O material coletado foi transferido para tubos estéreis, contendo 5 mL de tampão fosfato salino (PBS) (pH  $7,2 \pm 0,1$ ) (Laborclin). Os tubos foram transportados em condições refrigeradas para a Universidade de Brasília, onde foram agitados vigorosamente e centrifugados por 10 minutos a 4000 rpm, para a precipitação das células. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de tampão [10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl] e aquecidas à 95°C por 15 minutos (Nindl *et al.* 1999). O material biológico assim obtido foi armazenado em *freezer* a -80 °C.

Para controle da qualidade do DNA desse material, foi realizada amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR), usando-se os iniciadores pCO3 (5' ACACAAGTGTGTTT ACTAGC 3') / pCO4 (5' CAACTTCATCCACGTTTACC 3'), que amplificam um fragmento de 110 pb do gene da beta globina. As amostras negativas para a amplificação da beta globina foram consideradas inadequadas e excluídas do estudo.

**Detecção e genotipagem do HPV.** Para detecção da infecção por HPV, as amostras foram amplificadas por PCR, usando-se iniciadores específicos para um fragmento do gene L1 (MY09: 5' CGTCCMARRGGAWACTGATC 3' / MY11: 5'

GCMCAGGGWCAT AAYAATGG 3') (Bernard *et al.* 1994; Peyton *et al.* 1994), além de controles negativos e positivos adequados. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50 µL, contendo 10-15 µL do material biológico obtido conforme descrito acima, 20 mM de TrisHCl (pH 8,4) (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 250 µM de dATP, dCTP, dTTP e dGTP (Invitrogen), 40 pmoles de cada iniciador e 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). Quarenta ciclos de amplificação foram conduzidos no termociclador MJ Research PTC-100 (primeiro ciclo: 95°C-5min, 55°C-1min, 72°C-2min; segundo ao 39º ciclo: 95°C-1min, 55°C-1min, 72°C-2min; 40º ciclo: 95°C-1min, 55°C-1min, 72°C-8min). As amostras amplificadas foram analisadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (Sambrook *et al.* 1989).

As amostras que apresentaram produtos de PCR resultantes da amplificação por MY09/MY11 com fragmentos de aproximadamente 450 pares de bases (pb) foram submetidas à digestão com as enzimas de restrição *Bam* HI, *Dde* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Pst* I, *Rsa* I e *Sau* 3AI, seguida de análise de polimorfismo (*restriction fragment length polymorphism* - RFLP). Nessa metodologia, cada amostra digerida foi analisada em gel de poliacrilamida 8% e comparada com perfis de restrição característicos de cada genótipo de HPV descritos na literatura (Bernard *et al.* 1994).

As amostras cujo material genético não apresentou amplificação com MY09/MY11 foram consideradas negativas para a presença de HPV, de acordo com a metodologia utilizada.

As amostras amplificadas com MY09/MY11 que não puderam ser genotipadas por RFLP foram clonadas em vetor *pGEM-T easy* (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Os plasmídeos foram utilizados para transformar bactérias *Escherichia coli* da linhagem DH5α, pelo método de choque térmico. Inicialmente, 10 µL da solução contendo os plasmídeos foram incubados com 300 µL das células competentes no gelo por 40 minutos. Em seguida, as células foram submetidas a 42°C por 2 minutos, em banho-maria, e novamente transferidas para o banho de gelo por 1 minuto. Foram adicionados 700 µL de meio líquido 2xYT (1,6 mg/mL de triptona, 1,0 mg/mL de extrato de levedura e 85,6 mM de NaCl), que em seguida foi incubado a 37°C por 1 hora. Após a incubação, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 3000 rpm e 700 µL foram removidos por aspiração. As bactérias foram espalhadas em placas de Petri contendo meio sólido 2xYT, com 16,7 µmol de IPTG, 800 µg de X-Gal e 4mg/mL de ampicilina.



As placas de Petri foram incubadas durante a noite em estufa a 37 °C. Os clones recombinantes foram selecionados e incubados durante a noite a 37°C sob agitação em meio líquido 2xYT, contendo 4mg/mL de ampicilina. O DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o Kit *Sephaglas FlexiPrep*<sup>TM</sup> (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante.

O DNA plasmidial foi utilizado como molde para amplificação por PCR, utilizando os iniciadores universais M13. A reação foi realizada em um volume final de 50 µL, contendo: 1 µL do DNA plasmidial, 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen), 0,4 µM dos iniciadores M13F/M13R (Integrated DNA Technologies), 1,25 U da enzima *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), 1X de tampão da enzima (Invitrogen) e 1 mM de cloreto de magnésio (Invitrogen). As seguintes condições foram adotadas: desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos iniciadores a 55°C por 25 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos.

Os produtos da PCR que apresentaram o tamanho esperado foram purificados por precipitação com acetato de amônio 7,5M e etanol e seqüenciados automaticamente pelo método dideoxi-terminal fluorescente nos seqüenciadores Megabace System 1000 (GE HealthCare), no laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília, e ABI PRISM modelo 3100, na plataforma de seqüenciamento do Cenargen – Embrapa, o que permitiu a caracterização do(s) genótipo(s) do(s) vírus presente(s). O seqüenciamento permitiu, também, a identificação de variantes de HPV ainda não descritos na literatura (Cerqueira *et al.* 2003).

**Análise das seqüências.** As seqüências foram analisadas quanto às divergências nucleotídicas em relação às seqüências de referência dos HPVs correspondentes: HPV-11 (M14119), -33 (M12732), -53 (X74482), -59 (X77858), -62 (AY395706), -66 (U31794), -70 (U21941), -81 (AJ620209) e -102 (DQ080083). As comparações foram feitas usando-se o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.* 1997) seguidas de análise de alinhamento obtido pelo programa CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1994). As substituições de nucleotídeos encontradas foram confirmadas por um segundo PCR e seqüenciamento. A conservação entre as trocas de aminoácidos foi verificada pelo programa blastx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

**Caracterização dos variantes do genótipo 18 de HPV.** Os variantes do genótipo 18, um HPV de alto risco, foram caracterizados por meio da amplificação e seqüenciamento automático da região regulatória ou LCR e dos genes E6 e L1.

A LCR foi amplificada utilizando-se os iniciadores 18LCRF e 18LCRR (1159 pb), o gene E6 com os iniciadores 18E6F e 18E6R (586 pb) e o gene L1 foi amplificado por *nested* PCR, utilizando-se os iniciadores 18L1F e 18L1R (1824 pb) na 1ª etapa e os iniciadores 18L12F e 18L12R na 2ª etapa (1716 pb) (Arias-Pulido *et al.* 2005) (Tabela 2). As condições para amplificação foram as mesmas das acima descritas, usadas na amplificação do fragmento MY09/MY11 do gene L1. A caracterização foi realizada por meio da análise das seqüências nucleotídicas das regiões genômicas amplificadas em relação à seqüência de referência do HPV-18 depositada no banco genômico (número de acesso: AY262282).

O material genético amplificado por PCR foi precipitado com acetato de amônio para posterior seqüenciamento pelo método dideoxi-terminal fluorescente nos seqüenciadores Megabace System 1000 (GE HealthCare) e ABI PRISM modelo 3100. A precipitação foi realizada pela adição de 0,5 volume de acetato de amônio 7,5 M e 2,5 volume de etanol 100%. As amostras foram mantidas em freezer a -80°C por, pelo menos, 30 minutos e depois centrifugadas a 12000 rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante assim obtido foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% para posterior centrifugação a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi novamente descartado e o DNA foi mantido em temperatura ambiente para secagem e ressuspensão em água miliQ.

**Tabela 2.** Seqüências dos iniciadores utilizados na amplificação de fragmentos genômicos da LCR e dos genes E6 e L1 do HPV-18 (Arias-Pulido *et al.* 2005).

LCR	E6	L1
<b>18LCRF:</b> 5' ACCTGCCAAGCGT GTGCGTG 3'	<b>18E6F:</b> 5' AGTAACCGAAAACGG TCGGGA 3'	<b>18L1F:</b> 5' CCACTATATCTTCTGCC TCTTCCTA 3'
<b>18LCRR:</b> 5' TGTATAACCCAGT GTTAGTTAG 3'	<b>18E6R:</b> 5' CAATGTCTTGCAATG TTGCC 3'	<b>18L1R:</b> 5'CAAACACAGGACATACAA ACACAACA 3'
nts 7100 a 402; 1159 pb	nts 38 a 623; 586 pb	nts 5370 a 7193; 1824 pb
<b>HPV18</b>		<b>18L1(2)F:</b> 5' TCTTGGGATGTGCC TGTATACACGG 3'
		<b>18L1(2)R:</b> 5' ATATTACTTCCTGG CACGTACACGCA 3'
		nts 5423 a 7139; 1716 pb

**Análise filogenética do HPV-18.** As análises filogenéticas foram conduzidas utilizando-se o programa PAUP\*4.0b10 (Swofford *et al.* 1996). O alinhamento de múltiplas seqüências foi realizado pelo programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*

1997) e editado pelo programa BioEdit. O modelo de substituição foi selecionado utilizando-se o programa modeltest 3.06 (Posada & Crandall 1998). A construção da árvore filogenética foi realizada pelo algoritmo de *neighbor-joining* (NJ). A árvore obtida foi construída com o modelo de substituição TVM, incluindo o parâmetro de distribuição no formato Gamma e sítios invariáveis. A confiabilidade das árvores NJ foi avaliada pela análise de 1000 réplicas. O teste de razão de verossimilhança foi utilizado para dar respaldo estatístico aos ramos (expresso por valor de p).

Para análise filogenética e comparação das linhagens de HPV-18 circulantes no DF com aquelas depositadas no *GenBank*, foram utilizados fragmentos de 560 pb das seqüências da LCR dos variantes do HPV-18 Asiático-Americano (NC\_001357, AY262282, AY863171, AY863170, AY863169, AY863168, AY863167 e X05015); Europeu (AY863185, AY863184, AY863183, AY863182, AY863181, AY863180, AY863179, AY863178, AY863177, AY863186, AY863175, AY863174 e AY863173) e Africano (AY863191, AY863190, AY863189, AY863188, AY863187 e AY863186). A seqüência de referência do HPV-45 (X74479) foi utilizada como grupo externo. As árvores foram visualizadas pelo programa TreeView 1.4 (Page 1996).

As seqüências utilizadas na construção da árvore filogenética foram descritas por Arias-Pulido *et al.* (2005), em estudo sobre variantes do HPV-18 de amostras provenientes dos Estados Unidos.

Para análise da distância genética, todas as seqüências de nucleotídeos utilizadas para análise filogenética foram alinhadas no CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1997) e editadas no Bioedit. Foi realizada a análise de distância genética da LCR, entre as seqüências dos diferentes variantes de HPV-18 depositadas no *GenBank* e as obtidas nesse estudo. Para isso foi utilizado o programa Mega (Kumar *et al.* 2004).

**Análise dos dados.** Foi gerado um banco de dados no programa Epi-Info (CDC) para análise estatística e estabelecimento de correlações entre os parâmetros estudados, a saber:

- Prevalência da infecção por HPV em mulheres HIV positivas;
- Frequência dos genótipos de HPV nessa população;
- Frequência dos variantes do HPV-18;
- Prevalência de lesões cervicais associadas à infecção por HPV;

- Relação entre os marcadores da infecção pelo HIV, presença de infecção pelo HPV e laudo citopatológico;
- Relação entre tratamento anti-retroviral, a presença de infecção por HPV e o laudo citopatológico.

Foi fixado um nível de significância estatística  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

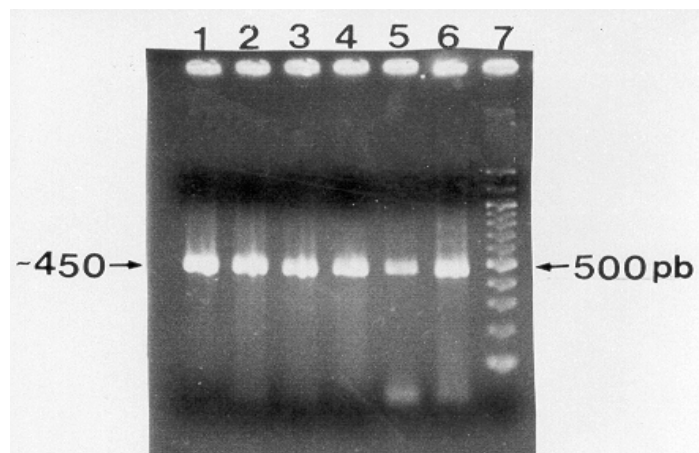
Foram obtidas 200 amostras de células da mucosa da cérvix uterina, provenientes de pacientes infectadas por HIV-1 atendidas na rede de saúde do DF. Os dados referentes a essas amostras estão apresentados em anexo.

A análise do local de residência das 200 mulheres incluídas nesse estudo revelou os seguintes resultados para as Regiões Administrativas do DF e Entorno: Brasília (7,5%), Gama (5%), Taguatinga (5,5%), Brazlândia (2,5%), Sobradinho (6%), Planaltina (8,5%), Paranoá (1%), Núcleo Bandeirante (1%), Ceilândia (10,5%), Guará (7%), Cruzeiro (0,5%), Samambaia (10,5%), Santa Maria (3,5%), São Sebastião (3%), Recanto das Emas (6%), Lago Sul (1%), Riacho Fundo (2%), Candangolândia (0,5%), Águas Claras (1,5%), Sudoeste/Octogonal (0,5%) e Park Way (0,5%). Além disso, algumas mulheres incluídas nesse estudo e atendidas na rede de saúde do DF eram residentes em municípios do Estado de Goiás localizados nos arredores do DF: Luziânia (7%), Santo Antônio do Descoberto (0,5%), Águas Lindas de Goiás (1,5%), Valparaíso (2,5%), Cidade Ocidental (2%) e Formosa (1,5%). Para duas amostras (1%), os dados referentes ao local de residência não estavam disponíveis. Dessa forma, pode-se observar a representatividade da amostragem aqui analisada, visto que, nesse estudo, foram incluídas mulheres residentes na maioria das regiões administrativas do DF. Além disso, a distribuição dessas mulheres entre as regiões foi bastante semelhante, não havendo diferenças significativas entre a quantidade de pacientes residentes em cada região.

A média de idade foi de 35,8 anos (variação: 17-61; mediana: 35,5), com contagem de células CD4 variando de 2,0 a 1336 células/ $\mu$ L (média: 421,7; mediana: 393) e carga viral do HIV variando de indetectável ( $< 50$  cópias/mL) a 500000 cópias/mL (média: 18210,1; mediana: 942). Entre as mulheres HIV positivas analisadas, 30 (15%) estavam imunocomprometidas (contagem de CD4  $< 200/\mu$ L).

Dentre as 200 amostras analisadas, 82 (41%) apresentaram resultado positivo para HPV em PCR, enquanto 118 (59%) apresentaram resultado negativo para HPV em PCR (Figura 11).

A maioria das mulheres (75,5%;  $n = 151$ ) tinha idade igual ou superior a 30 anos. Foi possível observar que a presença de infecção por HPV foi significativamente maior (59,2%; 29/49) entre as mulheres com menos de 30 anos, quando comparadas àquelas com 30 anos ou mais (35,1%; 53/151) ( $p < 0,003$ ).



**Figura 11.** Perfil eletroforético dos produtos da PCR. 1-6: amostras amplificadas com os iniciadores MY09/MY11, mostrando fragmentos de cerca de 450 pb; 7: marcador de peso molecular (100 pb).

**HPV X Citopatologia.** As 200 amostras obtidas foram classificadas em dois grupos com relação aos laudos citopatológicos cervicais:

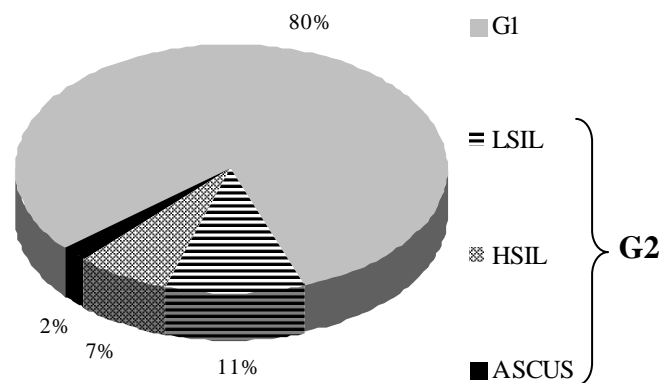
- o Grupo 1 (G1) – amostras com diagnóstico citopatológico descrito como: i) dentro dos limites da normalidade, no material examinado; ii) alterações celulares benignas, incluindo inflamação, reparação, metaplasia escamosa imatura, atrofia com inflamação ou radiação;

- o Grupo 2 (G2) – amostras com diagnóstico citopatológico alterado, com atipias celulares incluindo: i) lesão intra-epitelial de baixo grau - LSIL (compreendendo efeito citopático pelo HPV: HPV e neoplasia intra-epitelial cervical grau I: NIC I); ii) lesão intra-epitelial de alto grau - HSIL (compreendendo neoplasias intra-epiteliais cervicais graus II e III: NIC II e III); iii) células atípicas de significado indeterminado - ASCUS.

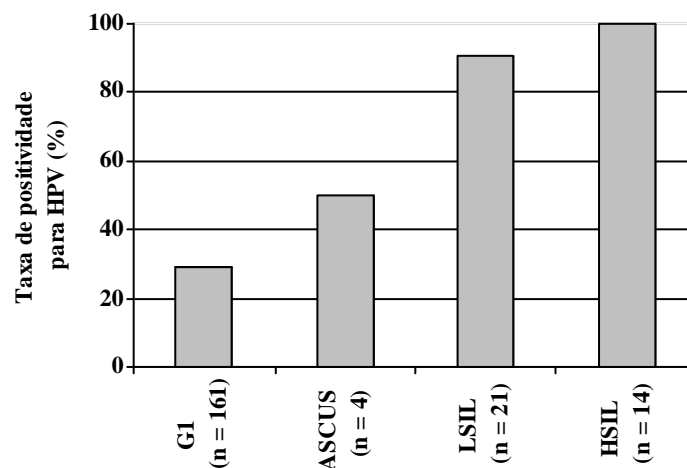
Com relação ao laudo citopatológico, 161 amostras (80,5%) apresentaram resultados normais ou apenas alterações celulares benignas, constituindo o grupo G1 e 39 amostras (19,5%) pertenciam ao grupo G2: LSIL (53,8%; 21/39); HSIL (35,9%; 14/39); e ASCUS (10,2%; 4/39) (Figura 12).

Em G1, 114 amostras (70,8%) apresentaram resultados negativos para HPV em PCR e 47 amostras (29,2%) apresentaram resultados positivos. Por outro lado, em G2, a maior parte das amostras (89,7%; 35/39) foram positivas para HPV e apenas quatro amostras (10,3%) foram negativas (Tabela 3). Dessa forma, foi possível observar uma associação significativa entre a presença de infecção por HPV e a detecção de anormalidades citopatológicas (G2) ( $p < 0,0001$ ) (Figura 13). É importante salientar que a verificação da associação estatística foi realizada antes da separação das mulheres nos

grupos G1 e G2, com análise da população total (200 mulheres) para estabelecimento da significância estatística.



**Figura 12.** Distribuição dos laudos citopatológicos entre as pacientes do Distrito Federal e Entorno. G1: grupo 1, incluindo diagnóstico citopatológico normal ou alterações celulares benignas; G2: grupo 2, incluindo LSIL: lesão intra-epitelial de baixo grau; HSIL: lesão intra-epitelial de alto grau; ASCUS: células atípicas de significado indeterminado.



**Figura 13.** Taxas de positividade para DNA do HPV entre amostras com laudo citopatológico normal ou alterações celulares benignas (G1) (80,5%), células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS) (2%), lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LSIL) (10,5%), lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (HSIL) (7%).  $p < 0,0001$ .

A análise dos genótipos de HPV entre os dois grupos citológicos revelou que, em G1, 66% das amostras positivas para DNA de HPV estavam infectadas por HPVs de alto risco e 34% por HPVs de baixo risco. Em G2, a maioria das amostras HPV-positivas também foi positiva para infecção por genótipos de alto risco (80%; 28/35) e apenas sete amostras (20%) estavam infectadas por genótipos de HPV de baixo risco

(Tabela 4). Uma associação significativa entre os HPVs de alto risco e G2 pôde ser observada ( $p < 0,0001$ ).

**Tabela 3.** Relação entre os laudos citopatológicos e a positividade para DNA do HPV, agrupados de acordo com a severidade das lesões.

Grupo	Diagnóstico Citopatológico	n	%	Positividade para DNA
				do HPV n (%)
G1 <sup>a</sup>	Normal	47	23,5	11 (23,4)
	Alterações celulares benignas	114	57	36 (31,6)
	<b>Total (G1)</b>	<b>161</b>	<b>80,5</b>	<b>47 (29,2)</b>
G2 <sup>b</sup>	ASCUS	4	2	2 (50)
	LSIL	21	10,5	19 (90,5)
	HSIL	14	7	14 (100)
	<b>Total (G2)</b>	<b>39</b>	<b>19,5</b>	<b>35 (89,7)</b>
Total		200	100	82 (41)

<sup>a</sup> G1 = Alterações celulares benignas ou resultados normais;

<sup>b</sup> G2 = LSIL: lesão intra-epitelial de baixo grau; HSIL: lesão intra-epitelial de alto grau; ASCUS: células atípicas de significado indeterminado.

**Genotipagem.** O DNA do HPV foi identificado em 82 (41%) das 200 mulheres HIV-positivas. Dessas amostras positivas para HPV, 72% estavam infectadas com genótipos oncogênicos (59/82). A distribuição desses genótipos, de acordo com o risco de desenvolvimento de câncer cervical, está apresentada na Figura 14.

Dos 27 genótipos detectados, 17 (63%) eram de alto risco e 10 (37%) de baixo risco. Os HPVs -16 e -18 foram os mais prevalentes (12,2%;  $n = 10$ ), seguidos pelos HPVs -52 (9,8%;  $n = 8$ ), 35, 53, 58, 62 e 70 (7,3%;  $n = 6$ ), 33 e 66 (6,1%;  $n = 5$ ), 18, 31, 56 e 61 (4,9%;  $n = 4$ ), 71 (3,7%;  $n = 3$ ), 6b, 11, 39, 40 e 54 (2,4%;  $n = 2$ ) e 32, 59, 67, 68, 72, 85 e 102 (1,2%;  $n = 1$ ) (Figura 14). Vale ressaltar a identificação de uma amostra infectada por HPV-102, visto que este genótipo viral de baixo risco foi apenas recentemente descrito na literatura (Narechania *et al.* 2005). O perfil de digestão da amostra 77 (HPV-102) está apresentado na Figura 15.

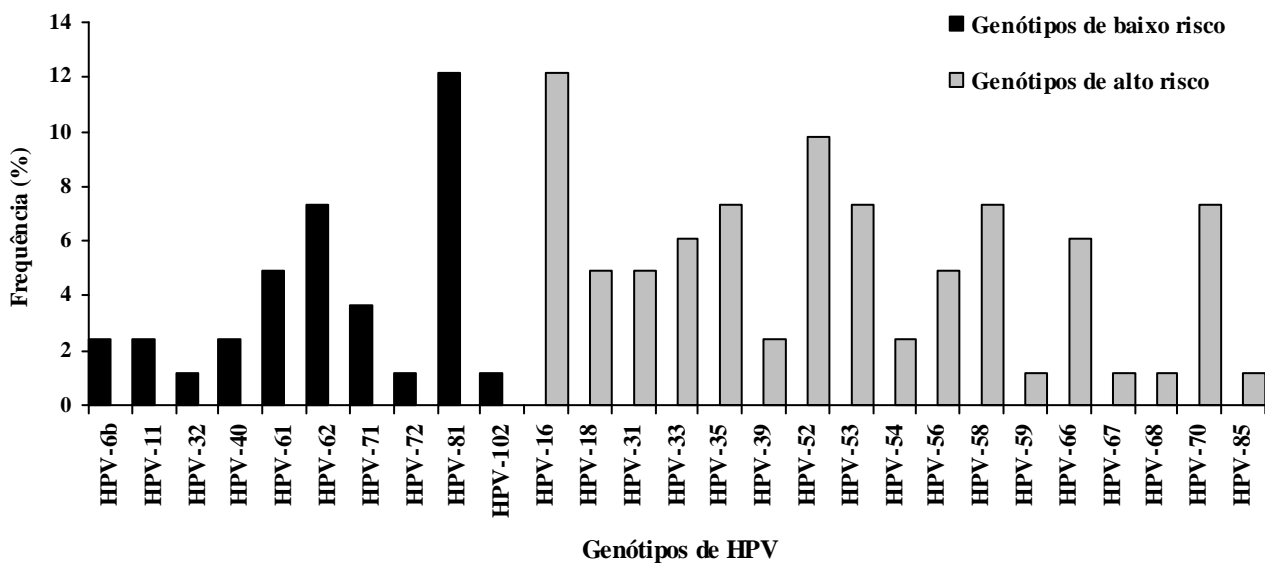


**Tabela 4.** Prevalência dos genótipos de HPV entre as mulheres HIV e HPV-positivas.

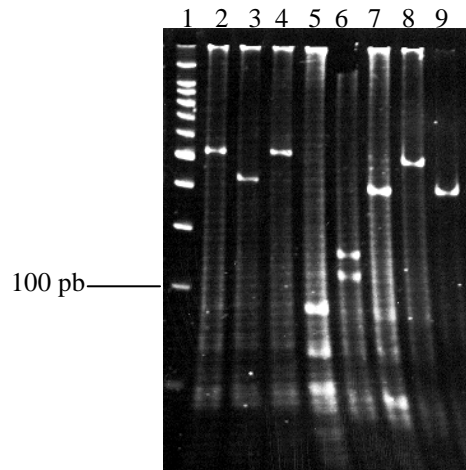
Genótipos de HPV de baixo risco	G1 <sup>b</sup>	G2 <sup>c</sup>	TOTAL		Genótipos de HPV de alto risco	G1 <sup>b</sup>	G2 <sup>c</sup>	TOTAL	
	n = 47	n = 35	n	%		n = 47	n = 35	n	%
6b	1	1	2	2,4	16 <sup>a</sup>	5	5	10	12,2
11 <sup>a</sup>	0	2	2	2,4	18 <sup>a</sup>	3	1	4	4,9
32 <sup>a</sup>	1	0	1	1,2	31	1	3	4	4,9
40 <sup>a</sup>	1	1	2	2,4	33 <sup>a</sup>	1	4	5	6,1
61 <sup>a</sup>	2	2	4	4,9	35 <sup>a</sup>	2	4	6	7,3
62 <sup>a</sup>	6	0	6	7,3	39 <sup>a</sup>	0	2	2	2,4
71 <sup>a</sup>	2	1	3	3,7	52 <sup>a</sup>	5	3	8	9,8
72	1	0	1	1,2	53 <sup>a</sup>	4	2	6	7,3
81 <sup>a</sup>	8	2	10	12,2	54	2	0	2	2,4
102	1	0	1	1,2	56	3	1	4	4,9
					58 <sup>a</sup>	1	5	6	7,3
					59	0	1	1	1,2
					66 <sup>a</sup>	4	1	5	6,1
					67	1	0	1	1,2
					68 <sup>a</sup>	1	0	1	1,2
					70 <sup>a</sup>	3	3	6	7,3
					85 <sup>a</sup>	1	0	1	1,2
<b>Total: baixo risco</b>	23	9	32	39	<b>Total: alto risco</b>	37	35	72	87,8

<sup>a</sup> Genótipos identificados em amostras co-infectadas.; <sup>b</sup> G1 = Alterações celulares benignas ou resultados normais; <sup>c</sup> G2 = lesão intra-epitelial de baixo grau, lesão intra-epitelial de alto grau ou células atípicas de significado indeterminado.

A classificação segue o esquema proposto por de Villiers *et al.* (2004).



**Figura 14.** Frequência dos genótipos de HPV entre as mulheres HIV-positivas no Distrito Federal e Entorno.



**Figura 15.** Perfil do polimorfismo de restrição do HPV-102 (1: marcador 100 pb; 2: amostra não digerida; 3-9: digestão com as enzimas *Bam* HI, *Dde* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Pst* I, *Rsa* I e *Sau* 3AI, respectivamente).

A análise por RFLP sugeriu que 26 (31,7%) das 82 pacientes positivas para DNA do HPV estavam infectadas por múltiplos genótipos. Dentre elas, 14 amostras (53,8%) apresentaram citologia alterada e 12 (46,2%) apresentaram resultados citológicos normais. Dessas 26 amostras com infecção por múltiplos genótipos de HPV, 20 (76,9%) estavam infectadas por, pelo menos, um genótipo de HPV de alto risco. Para nove das amostras co-infectadas, apenas um dos genótipos foi determinado por RFLP (Tabela 4).

**Variantes de HPV.** Das 82 amostras caracterizadas como positivas para DNA do HPV, 11 (13,4%) (denominadas Bsb-05, Bsb-09, Bsb-23, Bsb-28, Bsb-45, Bsb-50, Bsb-77, Bsb-87, Bsb-98, Bsb-107 e Bsb-153) apresentaram perfis de polimorfismo de fragmentos de restrição atípicos e foram, subsequentemente, caracterizadas por seqüenciamento automático da região amplificada por MY09/MY11. É improvável que as variações observadas nas seqüências apresentadas sejam provocadas por erros produzidos durante os processos de amplificação e seqüenciamento, pois, pelo menos dois produtos de PCR independentes foram analisados e cada reação de seqüenciamento foi confirmada. As seqüências obtidas foram depositadas no *GenBank*.

A seqüência do fragmento MY do gene L1 da amostra Bsb-05 (EF626586), obtida a partir de amostra cervical com alterações celulares benignas, apresentou quatro trocas nucleotídicas já descritas na literatura (Fu *et al.* 2004) quando comparada à seqüência de referência do HPV-62 (NC006357) (similaridade de 99,1%). As mutações G6793A, T6808A e G6880A foram silenciosas, enquanto a mutação A7055G provocou a troca de resíduo de aminoácido não conservativa T427A (Figura 16).

A análise da amostra Bsb-87 (EF626592), que também foi obtida a partir de material cervical com alterações celulares benignas, revelou a presença de quatro trocas de nucleotídeos em relação à seqüência de referência do HPV-62 (AY395706): G6727A, C6733A, C7159T e G7174A. Todas essas mutações foram silenciosas e apenas C6733A ainda não estava descrita na literatura (Figura 16).

HPV-62	Posição de variação de nucleotídeos em L1							
	6	6	6	6	6	7	7	7
Amostras	7	7	7	8	8	0	1	1
	2	3	9	0	8	5	5	7
	7	3	3	8	0	5	9	4
Referência	G	C	G	T	G	A	C	G
Bsb-05 (G1)	-	-	A	A	A	G	-	-
Bsb-87 (G1)	A	A	-	-	-	-	T	A
<b>Posição dos códons alterados</b>						<b>427</b>		
Referência						T		
Aminoácidos alterados						A		

**Figura 16.** Variabilidade genética nas amostras de HPV-62, Bsb-05 e Bsb-87. As posições nucleotídicas dos sítios polimórficos são indicadas no topo da figura. A numeração refere-se ao primeiro nucleotídeo do genoma de referência do HPV-62 (AY395706). Cada linha indica, da esquerda para a direita, a identificação do isolado e sua classificação citopatológica como G1 (normal) ou G2 (alterada) e o alinhamento da seqüência nucleotídica comparada à referência. A troca de aminoácido não-conservativa e sua posição estão indicadas, em comparação ao resíduo de aminoácido original. A mutação ainda não descrita na literatura está destacada em cinza.

A amostra Bsb-09 (EF626587), obtida a partir de amostra com neoplasia intra-epitelial cervical de grau II (NIC II), apresentou 98,8% de similaridade à seqüência de referência do HPV-70 (U21941). Foram detectadas cinco mutações nessa amostra: T6741A, T6971A, T6975C, T6976C e G6781A. No entanto, apenas a mutação T6971A estava associada a uma alteração de aminoácido conservativa, F461Y. As mutações T6971A e T6975C ainda não haviam sido descritas na literatura (Figura 17).

A amostra Bsb-23 (EF626588), obtida de amostra cervical normal, apresentou 99,3% de similaridade à seqüência de referência do HPV-33 (M12732). Três mutações foram encontradas nessa amostra: A6664G, A6748C e T6929A. Dentre elas, duas, A6748C e T6929A, provocaram as trocas de resíduos de aminoácidos E385D (conservativa) e W446R (não conservativa), respectivamente. Apenas a mutação T6929A ainda não estava descrita na literatura (Figura 18).

HPV-70	Posição de variação de nucleotídeos em L1				
Amostras	6	6	6	6	6
	7	9	9	9	7
	4	7	7	7	8
	1	1	5	6	1
Referência	T	T	T	T	G
Bsb-09 (G2)	A	A	C	C	A
<b>Posição dos códons alterados</b>		461			
Referência		F			
Aminoácidos alterados		Y			

**Figura 17.** Variabilidade genética na amostra de HPV-70, Bsb-09. As posições nucleotídicas dos sítios polimórficos são indicadas no topo da figura. A numeração refere-se ao primeiro nucleotídeo do genoma de referência do HPV-70 (U21941). Cada linha indica, da esquerda para a direita, a identificação da amostra e sua classificação citopatológica como G1 (normal) ou G2 (alterada) e o alinhamento da seqüência nucleotídica comparada à referência. A troca conservativa de aminoácido e sua posição estão indicadas, em comparação ao resíduo de aminoácido original. As mutações ainda não descritas na literatura estão destacadas em cinza.

HPV-33	Posição de variação de nucleotídeos em L1			
Amostras	6	6	6	6
	5	6	7	9
	4	6	4	2
	4	4	8	9
Referência	A	A	A	T
Bsb-23 (G1)	-	G	C	A
Bsb-98 (G2)	G	-	-	-
<b>Posição dos códons alterados</b>			385	<b>446</b>
Referência			E	<b>W</b>
Aminoácidos alterados			D	<b>R</b>

**Figura 18.** Variabilidade genética nas amostras de HPV-33, Bsb-23 e Bsb-98. As posições nucleotídicas dos sítios polimórficos são indicadas no topo da figura. A numeração refere-se ao primeiro nucleotídeo do genoma de referência do HPV-33 (M12732). Cada linha indica, da esquerda para a direita, a identificação da amostra e sua classificação citopatológica como G1 (normal) ou G2 (alterada) e o alinhamento da seqüência nucleotídica comparada à referência. As trocas de aminoácidos e suas posições estão indicadas, em comparação ao resíduo de aminoácido original. A substituição de resíduo de aminoácido não-conservativa está em negrito e as mutações ainda não descritas na literatura estão destacadas em cinza.

Na amostra Bsb-98 (DQ486473), apenas uma troca nucleotídica sinônima, A6544G, foi observada, indicando uma similaridade de 99% à seqüência de referência do HPV-33 (M12732). Essa mutação não foi identificada entre as seqüências de HPV-33 depositadas no *GenBank* (Figura 18). A amostra Bsb-98 foi obtida a partir de NIC III.

A similaridade nucleotídica entre a seqüência parcial de L1 da amostra Bsb-28 (DQ486471) comparada com a seqüência de referência do HPV-59 (X77858) foi 98% e a similaridade de aminoácidos entre elas foi de 97%. Essa amostra foi obtida a partir de

amostra cervical portadora de efeitos citopáticos compatíveis com infecção por HPV. Oito trocas nucleotídicas foram identificadas na região MY09/MY11 de L1. Todas essas trocas já haviam sido identificadas em seqüências depositadas no *GenBank*. Conforme mostrado na figura 19, quatro dessas mutações resultaram em trocas de resíduos de aminoácidos, ao passo que as demais eram mutações silenciosas. As substituições de nucleotídeos T6553A, T6653G, C6950A e G7000T levaram às seguintes trocas de resíduos de aminoácidos: L319H, S350A, P449T e L465F, respectivamente. Todas essas foram trocas não-conservativas, com exceção da presente no códon 350. As mutações sinônimas foram T6560C, T6561A, A6562T e T6997C. Três dessas trocas de nucleotídeos (T6653G, C6950A e G7000T) já foram descritas em um variante do HPV-59 isolado no Brasil, denominado ISIBRI49 (AF374230) (Figura 19).

HPV-59	Posição de variação de nucleotídeos em L1								
	6	6	6	6	6	6	6	6	7
Amostras	5	5	5	5	5	6	9	9	0
	5	6	6	6	9	5	5	9	0
	3	0	1	2	3	3	0	7	0
Referência	T	T	T	A	T	T	C	T	G
ISIBRI49	-	-	-	-	C	G	A	-	T
Bsb-28 (G2)	A	C	A	T	T	G	A	C	T
<b>Posição dos códons alterados</b>	<b>319</b>					350	<b>449</b>		<b>465</b>
Referência	L					S	P		L
Aminoácidos alterados	<b>H</b>					A	<b>T</b>		<b>F</b>

**Figura 19.** Variabilidade genética na amostra de HPV-59, Bsb-28. As posições nucleotídicas dos sítios polimórficos são indicadas no topo da figura. A numeração refere-se ao primeiro nucleotídeo do genoma de referência do HPV-59 (X77858). Cada linha indica, da esquerda para a direita, a identificação do isolado e sua classificação citopatológica como G1 (normal) ou G2 (alterada) e o alinhamento da seqüência nucleotídica comparada à referência e ao isolado do Brasil ISIBRI49 (AF374230). As trocas de resíduos de aminoácidos e suas posições estão indicadas, em comparação ao resíduo de aminoácido original. As substituições de aminoácidos não-conservativas estão em negrito.

A amostra Bsb-45 (EF626589), isolada a partir de NIC I, apresentou uma única troca nucleotídica, silenciosa, ainda não descrita na literatura, T6709A, em relação à seqüência de referência do HPV-11 (M14119) (99,8% de similaridade) (Figura 20).

HPV-11	Posição de variação de nucleotídeos em L1
Amostras	6
	7
	0
	9
Referência	T
Bsb-45 (G2)	A

**Figura 20.** Variabilidade genética na amostra de HPV-11, Bsb-45. A posição nucleotídica do sítio polimórfico é indicada no topo da figura. A numeração refere-se ao primeiro nucleotídeo do genoma de referência do HPV-11 (M14119). Cada linha indica, da esquerda para a direita, a identificação do isolado e sua classificação citopatológica como G1 (normal) ou G2 (alterada) e o alinhamento da sequência nucleotídica comparada à referência. A mutação ainda não descrita na literatura está destacada em cinza.

A amostra Bsb-50 (EF626590), com 99,3% de similaridade à sequência de referência do HPV-81 (AJ620209), apresentou três trocas nucleotídicas não previamente descritas na literatura: C6817T, A6848C e T7258A. Uma delas, A6848C, provocou a troca de resíduo de aminoácido conservativa M359L (Figura 21). Essa amostra foi obtida a partir de material cervical com alterações celulares benignas.

HPV-81	Posição de variação de nucleotídeos em L1		
Amostras	6	6	7
	8	8	2
	1	4	5
	7	8	8
Referência	C	A	T
Bsb-50 (G1)	T	C	A
<b>Posição dos códons alterados</b>		359	
Referência		L	
Aminoácidos alterados		M	

**Figura 21.** Variabilidade genética na amostra de HPV-81, Bsb-50. As posições nucleotídicas dos sítios polimórficos são indicadas no topo da figura. A numeração refere-se ao primeiro nucleotídeo do genoma de referência do HPV-81 (AJ620209). Cada linha indica, da esquerda para a direita, a identificação do isolado e sua classificação citopatológica como G1 (normal) ou G2 (alterada) e o alinhamento da sequência nucleotídica comparada à referência. A troca conservativa de aminoácidos e sua posição estão indicadas, em comparação ao resíduo de aminoácido original. As mutações ainda não descritas na literatura estão destacadas em cinza.

A amostra Bsb-77 (EF626591), obtida a partir de amostra cervical normal, apresentou cinco trocas nucleotídicas silenciosas não descritas na literatura (similaridade de 98,9%), C6738A, A6744T, C6747T, A7173G e G7185A, em relação à sequência de referência do HPV-102 (DQ080083) (Figura 22).

HPV-102	Posição de variação de nucleotídeos em L1				
	Amostras	6 7 3 8	6 7 4 4	6 7 4 7	7 1 7 3
Referência	C	A	C	A	G
Bsb-77 (G1)	A	T	T	G	A

**Figura 22.** Variabilidade genética na amostra de HPV-102, Bsb-77. As posições nucleotídicas dos sítios polimórficos são indicadas no topo da figura. A numeração refere-se ao primeiro nucleotídeo do genoma de referência do HPV-102 (DQ080083). Cada linha indica, da esquerda para a direita, a identificação do isolado e sua classificação citopatológica como G1 (normal) ou G2 (alterada) e o alinhamento da seqüência nucleotídica comparada à referência. As mutações ainda não descritas na literatura estão destacadas em cinza.

Onze substituições nucleotídicas já descritas na literatura foram detectadas na amostra Bsb-107 (DQ486474): C6597T, C6660T, C6711A, T6849C, C6855A, A6858G, G6927A, A6984G, G7017A, T7035A e A7036C, que foi obtida a partir de material cervical normal. Essas mutações foram todas silenciosas e resultaram em 97,6% de identidade entre a seqüência de Bsb-107 e a de referência do HPV-66 (U31794) (Figura 23).

HPV-66	Posição de variação de nucleotídeos em L1										
	Amostras	6 5 9 7	6 6 6 0	6 7 1 1	6 8 4 9	6 8 5 5	6 8 5 8	6 9 2 7	6 9 8 4	7 0 1 7	7 0 3 5
Referência	C	C	C	T	C	A	G	A	G	T	A
Bsb-107 (G1)	T	T	A	C	A	G	A	G	A	A	C

**Figura 23.** Variabilidade genética na amostra de HPV-66, Bsb-107. As posições nucleotídicas dos sítios polimórficos são indicadas no topo da figura. A numeração refere-se ao primeiro nucleotídeo do genoma de referência do HPV-66 (U31794). Cada linha indica, da esquerda para a direita, a identificação do isolado e sua classificação citopatológica como G1 (normal) ou G2 (alterada) e o alinhamento da seqüência nucleotídica comparada à referência.

Finalmente, a amostra Bsb-153 (DQ486475) tinha as seguintes trocas de nucleotídeos: C6596A, T6677A, C6683T, T6704C, A6740G, G6908A, G6998A, T7034C, C7040A e A7041C, que não estavam associadas a substituições de resíduos de aminoácidos. As mutações C6596A, T7034C, C7040A e A7041C não foram detectadas nos isolados de HPV-53 depositados no *GenBank*. A seqüência da amostra Bsb-153, obtida a partir de material cervical com alterações celulares benignas, foi 97,8% similar a de referência do HPV-53 (X74482) (Figura 24).

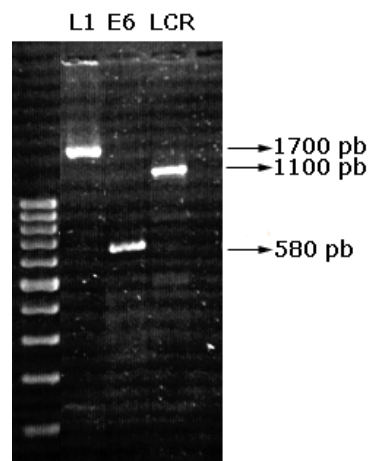
HPV-53	Posição de variação de nucleotídeos em L1									
	6	6	6	6	6	6	6	7	7	7
Amostras	5	6	6	7	7	9	9	0	0	0
	9	7	8	0	4	0	9	3	4	4
	6	7	3	4	0	8	8	4	0	1
Referência	C	T	C	T	A	G	G	T	C	A
Bsb-153 (G1)	A	A	T	C	G	A	A	C	A	C

**Figura 24.** Variabilidade genética na amostra de HPV-53, Bsb-153. As posições nucleotídicas dos sítios polimórficos são indicadas no topo da figura. A numeração refere-se ao primeiro nucleotídeo do genoma de referência do HPV-53 (X74482). Cada linha indica, da esquerda para a direita, a identificação do isolado e sua classificação citopatológica como G1 (normal) ou G2 (alterada) e o alinhamento da seqüência nucleotídica comparada à referência. As mutações ainda não descritas na literatura estão destacadas em cinza.

**Variantes do HPV-18.** Para a análise dos variantes do HPV-18, de alto risco, as quatro amostras caracterizadas como positivas para infecção por esse vírus foram amplificadas utilizando-se iniciadores específicos. Todas as substituições de nucleotídeos encontradas em amostras de variantes de HPV-18 foram confirmadas por meio de um novo PCR e seqüenciamento.

As quatro amostras de HPV-18 amplificaram conforme esperado para as regiões LCR, E6 e L1 (Figura 25). Para a amplificação do gene L1, foi realizada a estratégia de *nested* PCR, conforme descrito na literatura (Arias-Pulido *et al.* 2005). A amostra Bsb-27 foi obtida a partir de material cervical com NIC II; as amostras Bsb-48 e Bsb-206 a partir de material cervical com alterações celulares benignas; e a amostra Bsb-82 a partir de material cervical citologicamente normal.

O isolado protótipo do HPV-18, cuja seqüência foi utilizada como referência nesse estudo, é classificado como um variante Asiático-Americano (AA) e seu número de acesso no *GenBank* é AY262282.



**Figura 25.** Perfil eletroforético do HPV-18, mostrando a amplificação do gene E6 (586 pb), da LCR (1159 pb) e do gene L1 (1716 pb).



A caracterização do gene E6 das amostras de HPV-18 forneceu os seguintes resultados após comparação com a sequência de referência desse genótipo viral (AY262282): as amostras Bsb-27 (EF661654), Bsb-48 (EF661655) e Bsb-206 (EF661657) apresentaram duas trocas nucleotídicas silenciosas: T485C e C549A (similaridade de 99,6%). A amostra Bsb-82 (EF661656) apresentou, além das mutações silenciosas T485C e C549A, observadas em todas as amostras de HPV-18 desse estudo, as seguintes mutações nucleotídicas: T251C, G266A, T317C, G374A, C491A e A548G (similaridade de 98,6%). Apenas a mutação C491A provocou uma troca de resíduo de aminoácido, N129K, que não é conservativa (Figura 26). Em estudo recente sobre variantes do HPV-18, as mutações T251C e G266A também foram detectadas. No entanto, nesse estudo, foi realizada a caracterização apenas até o nucleotídeo 317 do gene E6, não sendo possível comparar as mutações detectadas nas outras posições (Arias-Pulido *et al.* 2005). Após a análise das sequências de HPV-18 depositadas no *GenBank*, constatou-se que todas as mutações aqui observadas já estavam descritas na literatura.

A análise da região LCR das quatro amostras de HPV-18 mostrou que Bsb-27 é um variante Europeu (E), com seis mutações em comparação ao genoma de referência (AY262282) (similaridade de 99,4%). A mutação C7413T da amostra Bsb-27 está localizada no segmento 5' da LCR e ainda não havia sido descrita na literatura; as mutações C7529A, A7567C, T7592C e A7670T localizam-se no segmento central e T104C está na parte 3' da LCR, em posição correspondente ao sítio de ligação do fator YY1 (Bauknecht *et al.* 1995). A amostra Bsb-48 (EF661658) também é um variante Europeu (E) do HPV-18 e possui cinco substituições em relação ao genoma de referência (similaridade de 99,2%). As cinco mutações detectadas nessa amostra estão localizadas no segmento central, que contém a maioria dos sítios de ligação para fatores de transcrição nos *enhancers* epitélio-específicos da LCR do HPV-18: C7529A, A7564C, A7567C, T7592C e A7670T. Além dessas, mais duas substituições estavam presentes na amostra Bsb-48 e localizadas no segmento 3' da LCR: A41G, posição correspondente ao sítio de ligação do fator Sp1 e T104C, localizada no sítio de ligação do fator YY1. Todas essas alterações, com exceção de A7564C, já haviam sido previamente descritas (Figura 27) (Arias-Pulido *et al.* 2005).

HPV-18	Posição de variação de nucleotídeos em E6							
Amostras	2	2	3	3	4	4	5	5
	5	6	1	7	8	9	4	4
	1	6	7	4	5	1	8	9
Referência	T	G	T	G	T	C	A	C
Bsb-27 (G2)	-	-	-	-	C	-	-	A
Bsb-48 (G1)	-	-	-	-	C	-	-	A
Bsb-82 (G1)	C	A	C	A	C	A	G	A
Bsb-206 (G1)	-	-	-	-	C	-	-	A
<b>Posição dos códons alterados</b>						<b>129</b>		
Referência						N		
Aminoácidos alterados						<b>K</b>		

**Figura 26.** Variabilidade genética do gene E6, mostrando as variações nas amostras de HPV-18, Bsb-27, Bsb-48, Bsb-82 e Bsb-206. As posições nucleotídicas dos sítios polimórficos são indicadas no topo da figura. A numeração refere-se aos primeiros nucleotídeos do genoma de referência do HPV-18 (AY262282). Cada linha indica, da esquerda para a direita, a identificação da amostra e sua classificação citopatológica em G1 (normal) ou G2 (alterada) e o alinhamento da seqüência nucleotídica comparada à referência. As trocas de aminoácidos e suas posições estão indicadas, em comparação ao resíduo de aminoácido original. As substituições de aminoácidos não-conservativas estão em negrito e as mutações ainda não descritas na literatura estão destacadas em cinza.

A amostra Bsb-82 (EF661659), por sua vez, é um variante Africano (Af) do HPV-18 e possui 17 substituições em relação ao genoma de referência (similaridade de 97,6%): T7258A, A7323G (segmento 5' da LCR), C7496G, G7512A, C7529A, T7530C, G7563A, A7567C, T7592C, T7643G, T7651C, A7658C, A7670T, T7704C, C7726T, C7730A (segmento central da LCR) e A92G (segmento 3' da LCR) (Figura 27). Todas essas alterações foram previamente descritas por Arias-Pulido *et al.* (2005), em estudo de caracterização de variantes do HPV-18 detectados nos Estados Unidos. A substituição C7726T está localizada em posição correspondente ao sítio de ligação do fator Oct-1 (Morris *et al.* 1993) e as mutações T7651C e A7658C estão localizadas no sítio de ligação do fator de transcrição específico de queratinócitos, KRF-1 (Butz & Hoppe-Seyler 1993).

A amostra Bsb-206 (EU034031) é um variante Europeu (E) do HPV-18 e possui sete substituições em relação ao genoma de referência (similaridade de 99,4%). A mutação A7180C detectada nesse isolado está localizada no segmento 5' da LCR; as mutações C7529A, G7563A, A7567C, T7592C e A7670T localizam-se no segmento central; e T104C no segmento 3' da LCR. Todas essas alterações, com exceção de A7180C, já haviam sido previamente descritas (Figura 27) (Arias-Pulido *et al.* 2005).

A alteração na posição T7592, detectada nas amostras Bsb-48, Bsb-82 e Bsb-206, foi observada, também, em todos os variantes do estudo conduzido por Sichero *et*

*al.* (2005). As substituições C7529A, A7567C, T7592C e A7670T estavam presentes em todos os variantes do estudo realizado por Villa *et al.* (2000). As variações nos nucleotídeos A41, A92 e T104 estão localizadas na origem de replicação do HPV-18 (Lee *et al.* 1998).

HPV-18	Posição de variação de nucleotídeos na LCR																			
Amostras	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	1	2	3	4	4	5	5	5	5	5	5	6	6	6	6	7	7	7	7	7
	8	5	2	1	9	1	2	3	6	6	6	9	4	5	5	7	0	2	3	3
	0	8	3	3	6	2	9	0	3	4	7	2	3	1	8	0	4	6	0	0
Referência AA	A	T	A	C	C	G	C	T	G	A	A	T	T	T	A	A	T	C	C	A
Bsb-27 E	-	-	-	T	-	-	A	-	-	-	C	C	-	-	-	T	-	-	-	-
Bsb-48 E	-	-	-	-	-	-	A	-	-	C	C	C	-	-	-	T	-	-	-	G
Bsb-82 Af	-	A	G	-	G	A	A	C	A	-	C	C	G	C	C	T	C	T	A	-
Bsb-206 E	C	-	-	-	-	-	A	-	A	-	C	C	-	-	-	T	-	-	-	-
Fator de transcrição														KRF-1	KRF-1			Oct-1		Spl
																				YY1

**Figura 27.** Variabilidade genética da LCR, mostrando as variações nas amostras de HPV-18, Bsb-27 (Europeu – E), Bsb-48 (Europeu – E), Bsb-82 (Africano – Af) e Bsb-206 (Europeu – E) em comparação ao genoma de referência (Asiático-Americano – AA). As posições nucleotídicas dos sítios polimórficos são indicadas no topo da figura. A numeração refere-se aos primeiros nucleotídeos do genoma de referência do HPV-18 (AY262282). Cada linha indica, da esquerda para a direita, a identificação da amostra e o alinhamento da sequência nucleotídica comparada à referência. Abaixo estão indicados os possíveis fatores de transcrição que se ligam nas respectivas posições nucleotídicas. As mutações ainda não descritas na literatura estão destacadas em cinza. Em destaque, nucleotídeos localizados na origem de replicação do HPV-18.

Após a análise do gene L1 das amostras de HPV-18, foi observado que a mutação C5875A, já descrita na literatura e observada em todas as amostras deste estudo, provocou a troca de resíduo de aminoácido não conservativa T149N. A mutação T5619A, previamente descrita na literatura e que levou à troca de resíduo de aminoácido conservativa L64M, e a mutação silenciosa A6401G, também já descrita, foram observadas nos três variantes E do HPV-18 (Bsb-27, Bsb-48 e Bsb-206) (Figura 28).

Adicionalmente, a amostra Bsb-27 apresentou a mutação C5486A, silenciosa e ainda não descrita na literatura. A amostra Bsb-48 apresentou uma mutação adicional: A6998G, silenciosa e já descrita em sequências do HPV-18 depositadas no *GenBank*. A amostra Bsb-82 apresentou o maior número de trocas nucleotídicas, conforme esperado por ser tratar de um variante Africano do HPV-18. As mutações silenciosas foram:

T5648C, C5684T, C5729T, A5832C, A5924T, C6017T, A6401G, T6581C, C6626T, C6632T, G6719A, G6749A, G6917A e C7064T. Apenas quatro substituições nucleotídicas estavam associadas a trocas de resíduos de aminoácidos: G5581A, que levou à troca conservativa R51K; A5584G, que levou à N52S, também conservativa; C5875A associada à T149N não conservativa; e G6579A que levou à troca conservativa V384I. As mutações C5729T, A5924T e C6632T ainda não haviam sido descritas na literatura. Finalmente, a amostra Bsb-206 não apresentou outras mutações, além das acima mencionadas (Figura 28).

HPV-18	Posição de variação de nucleotídeos em L1										
Amostras	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6
	4	5	5	6	6	6	7	8	8	9	0
	8	8	8	1	4	8	2	3	7	2	1
	6	1	4	9	8	4	9	2	5	4	7
Referência	C	G	A	T	T	C	C	A	C	A	C
Bsb-27	A	-	-	A	-	-	-	-	A	-	-
Bsb-48	-	-	-	A	-	-	-	-	A	-	-
Bsb-82	-	A	G	-	C	T	T	C	A	T	T
Bsb-206	-	-	-	A	-	-	-	-	A	-	-
<b>Posição dos códons alterados</b>		51	52	64					<b>149</b>		
Referência		R	N	L					T		
Aminoácidos alterados		K	S	M					N		

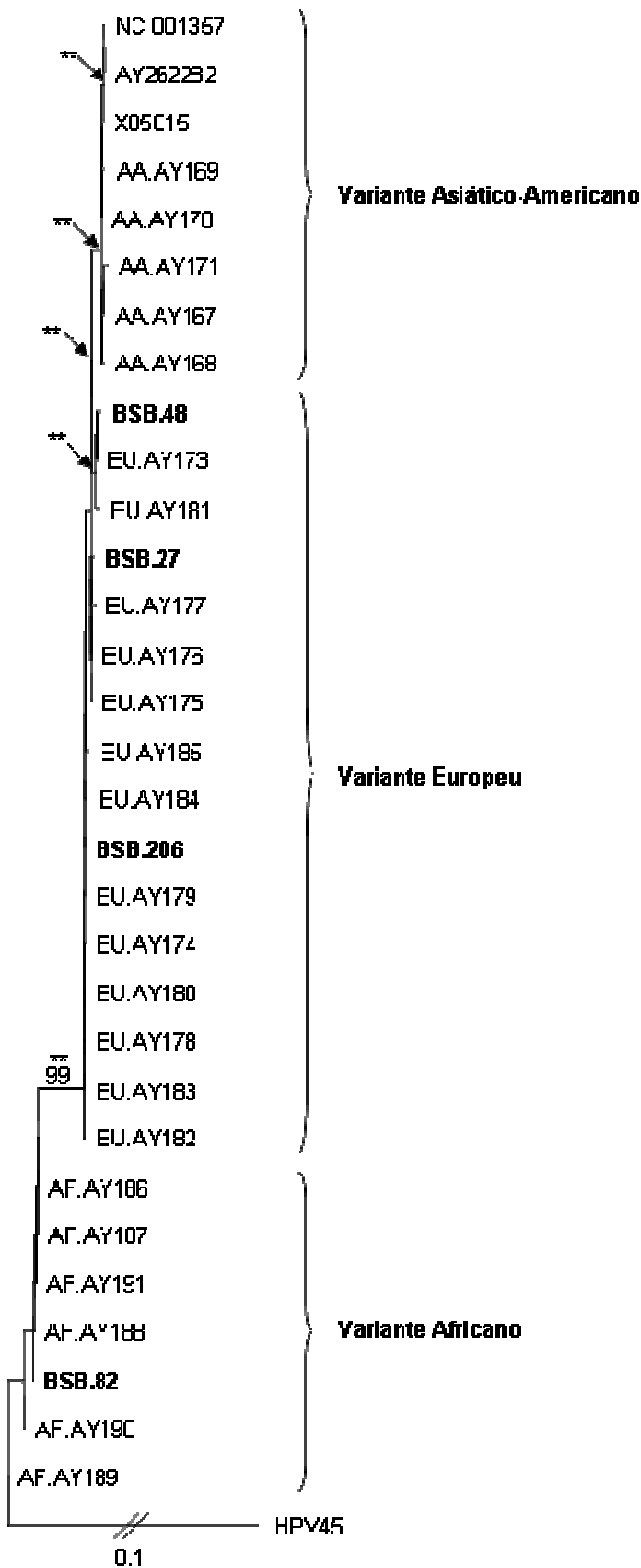
HPV-18	Posição de variação de nucleotídeos em L1									
Amostras	6	6	6	6	6	6	6	6	6	7
	4	5	5	6	6	7	7	9	9	0
	0	7	8	2	3	1	4	1	9	6
	1	9	1	6	2	9	9	7	8	4
Referência	A	G	T	C	C	G	G	G	A	C
Bsb-27	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bsb-48	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-
Bsb-82	G	A	C	T	T	A	A	A	-	T
Bsb-206	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Posição dos códons alterados</b>		384								
Referência		V								
Aminoácidos alterados		I								

**Figura 28.** Variabilidade genética do gene L1, mostrando as variações nas amostras de HPV-18, Bsb-27, Bsb-48, Bsb-82 e Bsb-206 em comparação ao genoma de referência do HPV-18. As posições nucleotídicas dos sítios polimórficos são indicadas no topo da figura. A numeração refere-se aos primeiros nucleotídeos do genoma de referência do HPV-18 (AY262282). Cada linha indica, da esquerda para a direita, a identificação da amostra e o alinhamento da seqüência nucleotídica comparada à referência. As trocas de aminoácidos e suas posições estão indicadas, em comparação ao resíduo de aminoácido original. As substituições de aminoácidos não-conservativas estão em negrito e as mutações ainda não descritas na literatura estão destacadas em cinza.

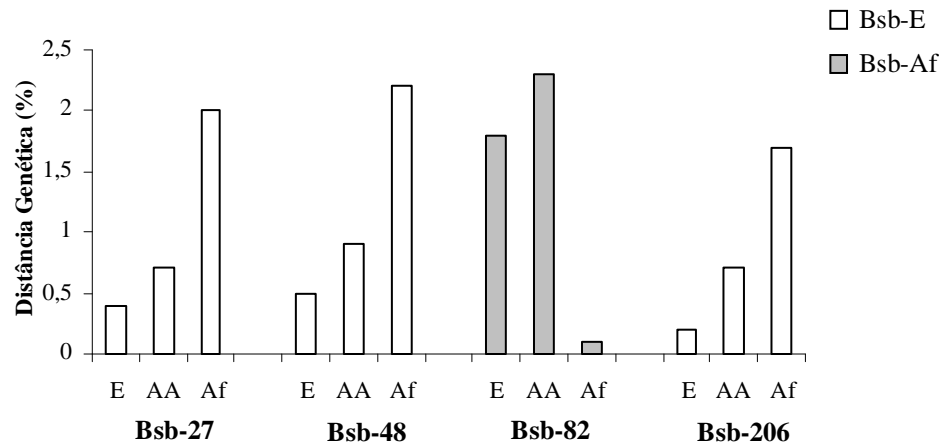
A análise filogenética foi realizada a partir de seqüências de 560 pb obtidas neste trabalho juntamente com as seqüências da LCR de HPV-18 depositadas no *GenBank*. No total, foram incluídas 31 amostras.

A análise filogenética revelou a formação de três cladogramas (Figura 29). O clado constituído pelos variantes AA apresentou um agrupamento formado pela seqüência de referência do HPV-18 (AY262282) e as outras duas seqüências derivadas de genomas completos dos protótipos de HPV-18 presentes no *GenBank* (NC\_001357 e X05015). Os demais variantes AA foram descritos por Arias-Pulido *et al.* (2005), nos Estados Unidos. O clado de variantes E continha as três amostras do DF (Bsb-27, Bsb-48 e Bsb-206), confirmando a classificação dessas amostras no ramo E. A amostra Bsb-48 estava mais próxima do variante AY173, também dos Estados Unidos. Finalmente, o clado de variantes Af incluiu uma amostra do DF (Bsb-82), conforme verificado na análise do seqüenciamento. As amostras do DF não formaram agrupamento distinto. A pequena distância genética observada entre os isolados de cada clado filogenético é demonstrada na árvore pela ausência de ramificações longas, o que indica a similaridade elevada entre os variantes estudados. Para o HPV-18, os isolados Af e os AA estão mais afastados filogeneticamente, podendo-se observar na árvore maior proximidade entre os variantes AA e E.

Os resultados obtidos na análise filogenética foram confirmados pela análise de distância genética da LCR, que demonstrou uma maior proximidade entre os variantes E do DF (Bsb-E) e os variantes E do banco genômico; e entre o variante Af do DF (Bsb-Af) e os variantes Af do HPV-18 depositados no *GenBank*. As distâncias genéticas foram: para Bsb-27 0,4% com E, 0,7% com AA e 2% com Af; para Bsb-48 0,5% com E, 0,9% com AA e 2,2% com Af; para Bsb-82 1,8% com E, 2,3% com AA e 0,1% com Af; para Bsb-206 0,2% com E, 0,7% com AA e 1,7% com Af (Figura 30). As médias das distâncias genéticas para os variantes E do DF (Bsb-E) foram de 0,3% com os variantes E, 0,8% com AA e 2% com Af do HPV-18.

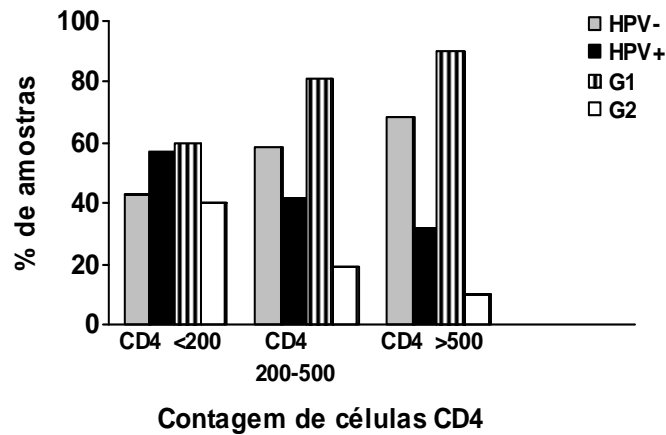


**Figura 29.** Análise filogenética do HPV-18, realizada pelo método de *neighbor-joining*, das seqüências nucleotídicas da LCR. O número mostrado no ponto de ramificação representa a porcentagem para o valor de *bootstrap* para 1000 réplicas. O teste de razão de verossimilhança foi utilizado para dar respaldo estatístico aos ramos (expresso por valor de *p*). \*\*  $p < 0,001$ . Em adição às amostras analisadas neste trabalho (Bsb, em negrito) estão presentes amostras do estudo de Arias-Pulido *et al.* (2005). As siglas que antecedem o número de acesso das amostras no *GenBank* indicam a classificação dos variantes: AA (Asiático-Americano); EU (Europeu) e AF (Africano). O HPV-45 foi usado como grupo externo. O valor da barra de escala no canto esquerdo inferior representa a distância genética em substituições por nucleotídeo do fragmento analisado.



**Figura 30.** Distância genética na LCR entre os variantes Europeus (Bsb-E: Bsb-27, Bsb-48 e Bsb-206) e Africano (Bsb-Af: Bsb-82) do DF e os variantes Europeus (E), Asiático-Americanos (AA) e Africanos (Af) do HPV-18 depositados no *GenBank*.

**HPV x HIV.** A frequência de infecção por HPV e de anormalidades citopatológicas nessa população foi analisada com relação à contagem de células CD4+ das mulheres infectadas por HIV. Para tanto, as mulheres foram divididas em três grupos: < 200, 200-500 e > 500 células CD4/ $\mu$ L. Trinta pacientes (15%) tinham CD4 < 200; dentre elas, 17 (56,7%) eram HPV+ e 12 (40%) apresentaram resultado alterado no exame citológico (G2). Das 110 pacientes (55%) com contagem de CD4 entre 200 e 500, 46 (41,8%) foram positivas para HPV e 21 (19,1%) pertenciam a G2. Finalmente, das 60 pacientes (30%) com contagem de CD4 > 500, 19 (31,7%) foram positivas para HPV e apenas seis (10%) apresentaram anormalidade no laudo citopatológico (Figura 31). As análises estatísticas sugeriram que as anormalidades citológicas estavam associadas ao nível de imunossupressão ( $p < 0,005$ ), porém não foi possível observar associação estatisticamente significativa entre a prevalência de infecção por HPV e o nível de imunossupressão (Tabela 5).



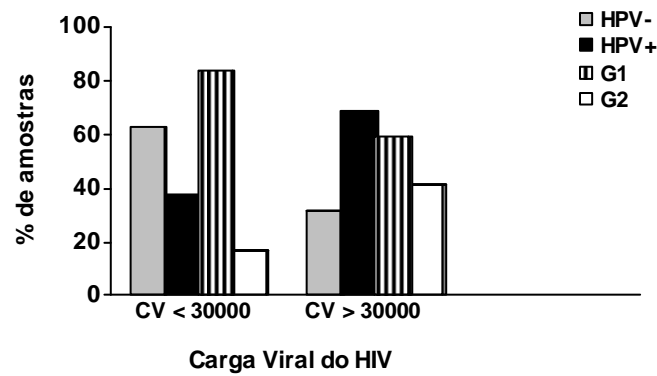
**Figura 31.** Relação entre a contagem de células T CD4<sup>+</sup>/μL e a frequência (%) de amostras com relação à positividade ou não para infecção por HPV e à ocorrência (G2) ou não (G1) de anormalidades no laudo citopatológico.

**Tabela 5.** Relação entre os resultados de exames citopatológicos, a infecção por HPV e os marcadores da infecção por HIV (CD4<sup>+</sup> e carga viral).

	Laudo Citopatológico	
	Normal / Alterações celulares benignas n = 161	Alterado n = 39
HPV negativo	114 (70,8%)	4 (10,3%)
HPV positivo, alto risco	31 (19,2%)	28 (71,8%)
HPV positivo, baixo risco	16 (9,9%)	7 (17,9%)
HPV positivo, co-infecção	12 (7,4%)	14 (35,9%)
CD4 <sup>+</sup> /μL média / mediana	446,9 / 415	317,8 / 280
Carga viral do HIV média / mediana	11351,4 / 780	46524,1 / 3736

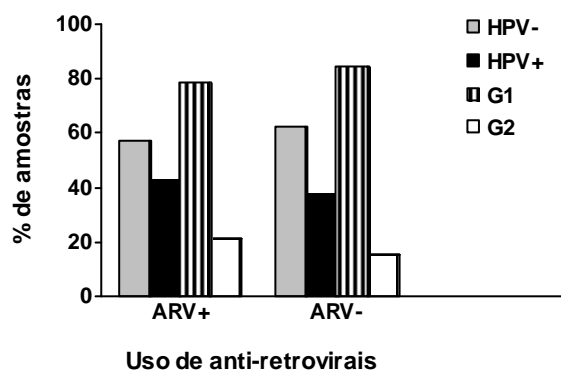
A carga viral do HIV estava associada à ocorrência de anormalidades citológicas e à detecção de DNA do HPV ( $p < 0,008$ ). Entre os 22 indivíduos com carga viral superior a 30000 cópias/mL, a prevalência de infecção por HPV foi de 68,2% e de anormalidades citológicas foi de 40,9%. Entre as 178 pacientes com carga viral menor que 30000 cópias/mL, o DNA do HPV foi detectado em 37,6% e anormalidades citológicas em 16,8% (Figura 32) (Tabela 5).





**Figura 32.** Relação entre a carga viral (CV) do HIV (cópias de RNA/mL) e a frequência (%) de amostras com relação à positividade ou não para infecção por HPV e à ocorrência (G2) ou não (G1) de anormalidades no laudo citopatológico.

A maioria (68%, n = 136) das pacientes estava sob algum tipo de tratamento anti-retroviral, com 16/136 (11,8%) em terapia quádrupla, 93/136 (68,4%) em tripla e 27/136 (19,8%) em dupla. Cinquenta e oito pacientes (42,6%) submetidas ao tratamento foram positivas para DNA do HPV e 78 (57,3%) foram negativas. Das 136 pacientes em tratamento, 29 (21,3%) apresentaram laudo citopatológico cervical alterado (G2). As demais 64 mulheres (32%) HIV positivas não estavam recebendo qualquer tratamento anti-retroviral ao entrar no estudo. Dentre elas, 37,5% (24/64) era positiva para DNA do HPV e 62,5% (40/64) era negativa. Dentre essas 64 pacientes que não estavam recebendo anti-retrovirais, 10 (15,6%) pertenciam a G2. Não foi observada uma associação significativa entre o uso de drogas anti-retrovirais e a presença de HPV ou de anormalidades citológicas (Figura 33) (Tabela 6).



**Figura 33.** Relação entre o uso de anti-retrovirais (ARV) e a frequência (%) de amostras com relação à positividade ou não para infecção por HPV e à ocorrência (G2) ou não (G1) de anormalidades no laudo citopatológico.

**Tabela 6.** Relação entre a presença de infecção por HPV, os marcadores da infecção por HIV (CD4+ e carga viral) e o tratamento anti-retroviral.

	HPV n (%)	HPV alto risco n (%)	HPV baixo risco n (%)
<b>CD4+/<math>\mu</math>L</b>			
< 200 (n = 30)	17 (56,7)	14 (46,7)	3 (10)
200-500 (n = 110)	46 (41,8)	33 (30)	13 (11,8)
> 500 (n = 60)	19 (31,7)	12 (20)	7 (11,7)
<b>HIV carga viral (cópias/mL)</b>			
< 30000 (n = 178)	67 (37,6)	45 (25,3)	22 (12,4)
> 30000 (n = 22)	15 (68,2)	14 (63,6)	1 (4,5)
<b>Terapia Anti-retroviral</b>			
Sim (n = 136)	58 (42,6)	40 (29,4)	18 (13,2)
Não (n = 64)	24 (37,5)	19 (29,7)	5 (7,8)

## DISCUSSÃO

**Prevalência do HPV.** As infecções por HPV são as doenças sexualmente transmitidas mais comuns atualmente. Estudos utilizando teste para DNA de HPV em mulheres assintomáticas na população geral estimam que a prevalência de infecção por HPV varie de 2-44% (Baseman & Koutsky 2005). Essa ampla variação nas estimativas de prevalência é bem explicada por diferenças de idade entre as amostras populacionais estudadas, por diferenças na sensibilidade dos vários ensaios usados para detectar o DNA do HPV e devido às diferenças entre as populações estudadas (Burchell *et al.* 2006; Trottier & Franco 2006).

Um estudo internacional multicêntrico conduzido pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) forneceu dados de 15 áreas em quatro continentes, envolvendo mulheres com idade entre 15 e 74 anos. A prevalência de HPV variou de menos de 5% em alguns países mediterrâneos e do sudeste asiático a mais de 15% em diversos países da América Latina e entre algumas populações africanas (Bosch *et al.* 2006).

Dados referentes à prevalência do HPV indicam que a positividade para esse vírus varia entre 27% a 70% na população em geral (Saslow *et al.* 2007; Trottier & Franco 2006). Já para as mulheres HIV-positivas, os relatos indicam taxas mais altas de infecção por HPV (40% a 95%) e de lesões cervicais (10% a 36%) do que entre as HIV-negativas (23% a 55% e 1% a 12%, respectivamente) (Jo & Kim 2005).

Em estudo anterior realizado no Distrito Federal (DF), foi observada uma prevalência de 62% de infecção por HPV entre mulheres HIV-negativas portadoras de anormalidades características de infecção por HPV nos exames citopatológicos cervicais (Camara *et al.* 2003). Esse resultado, juntamente com o obtido sobre a prevalência de HPV em mulheres HIV-positivas do DF (41%), e os divulgados em outros estudos, sugere que é necessário o monitoramento constante de patologias cervicais, especialmente entre mulheres infectadas por HIV (Chaturvedi *et al.* 2005; Ahdieh *et al.* 2001). Os resultados obtidos no DF, onde se observou uma menor prevalência de infecção por HPV entre as mulheres HIV+ (41%), quando comparadas às HIV- (62%), podem ser explicados pelo fato de que todas as mulheres não infectadas por HIV incluídas no estudo de Camara *et al.* (2003) possuíam anormalidades citopatológicas cervicais, que estão associadas à infecção por HPV. Por outro lado, no presente estudo, foram avaliadas mulheres infectadas por HIV, independente do

resultado do exame cervical, refletindo melhor a prevalência de infecção por HPV nessa população específica de mulheres HIV+.

A prevalência de infecção por HPV varia de acordo com a população em estudo. Chaturvedi e colaboradores (2005) observaram, nos Estados Unidos, uma prevalência de 48,7% de infecção por HPV em mulheres HIV-positivas. Em estudo conduzido na Itália sobre a distribuição dos HPVs entre mulheres imigrantes e com histórico de prostituição, observou-se que 42,2% das amostras foram positivas para HPV, com taxas de detecção de 57,1% entre as HIV-positivas e 35,5% entre as HIV-negativas (Tornesello *et al.* 2007). Na região sudeste do Brasil, foi demonstrado, por PCR, que 87% das mulheres HIV-positivas apresentavam DNA do HPV (Levi *et al.* 2004). Essas variações na prevalência de infecção por HPV refletem, provavelmente, diferenças nas populações estudadas e nos métodos de detecção do HPV utilizados (Chaturvedi *et al.* 2005). No geral, os resultados indicam que cerca de 50% das mulheres estão infectadas por HPV, caracterizando um problema mundial de saúde pública.

Na literatura relata-se, com frequência, que mulheres HIV-positivas possuem maior probabilidade de co-infecção por múltiplos genótipos do HPV. Esse aumento na prevalência de co-infecção por HPV está associado, mais frequentemente, à persistência ou ativação de infecções pré-existentes, devido à imunidade prejudicada, do que à aquisição de novas infecções (Queiroz *et al.* 2004). Chaturvedi e colaboradores, em 2005, relataram uma frequência de 26,5% de infecção por múltiplos genótipos de HPV em mulheres HIV-positivas, com um risco 4,25 vezes maior de co-infecção por HPV quando comparadas às HIV negativas. Em metanálise recente, foi observada uma prevalência de infecção por múltiplos genótipos de HPV entre mulheres também infectadas por HIV variando de 11,9% entre as que não tinham anormalidades citológicas a 34,7% para as que tinham ASCUS/LSIL e 41,1% para as com HSIL (Clifford *et al.* 2006). No estudo ora apresentado, observamos infecção mista por diferentes HPVs em 13% das mulheres HIV e HPV-positivas do DF e Entorno. No entanto, é importante frisar que os ensaios de PCR, usados na maioria dos estudos epidemiológicos, não foram otimizados para amplificação de múltiplos genótipos na mesma reação e que as seqüências de DNA de alguns HPVs são amplificadas com menos eficiência que outras. Essas limitações metodológicas podem resultar em subestimativas do número de genótipos em uma amostra (Trottier & Franco 2006).

**Diversidade genética.** O estudo genotípico de isolados do HPV é de grande importância para a detecção de polimorfismos virais em isolados locais e dos diferentes tipos genéticos que ocorrem em cada região. Desta forma, pode-se contribuir para o controle e para o tratamento da doença associada ao HPV, definindo-se a relevância de pesquisas epidemiológicas moleculares. Esses estudos podem fornecer evidências sobre a existência de diferenças biológicas na transmissibilidade e patogênese entre os diversos genótipos do HPV, além de contribuir para o desenvolvimento e utilização efetiva de vacinas. A distribuição dos genótipos do HPV no Brasil parece ser complexa, já que sua prevalência pode diferir significativamente mesmo entre cidades bem próximas. Porém, é importante destacar que a distribuição dos genótipos de HPV tem determinantes próprios, pois varia de acordo com as características populacionais, virais e ambientais. Dessa forma, os dados de um local não podem ser generalizados para todo o país ou mesmo para uma região geográfica. Além disso, conforme tem sido verificado na literatura, a distribuição dos diversos genótipos do HPV parece ser diferente de acordo com o cenário clínico em estudo como, por exemplo, entre populações HIV-positivas e HIV-negativas (Chaturvedi *et al.* 2005).

Existe, atualmente, um interesse crescente no desenvolvimento e no uso de vacinas contra os HPVs. No Brasil, a vacina quadrivalente contra os HPVs 6, 11, 16 e 18 já está registrada e em comercialização. Outras vacinas estão em fase de testes clínicos no Brasil, principalmente nas regiões Sul e Sudeste. O conhecimento da prevalência dos genótipos de HPV e dos variantes de um mesmo genótipo em populações não portadoras e portadoras de outras infecções transmitidas sexualmente (ITSs) é fundamental na escolha dos HPVs que serão incluídos nas vacinas, determinando a eficácia das mesmas (Calleja-Macias *et al.* 2005; Yamada *et al.* 1997). Dessa forma, a informação sobre a diversidade genética do HPV no DF, em diferentes cenários clínicos (mulheres HIV-negativas e HIV-positivas), é fundamental na análise da potencial eficácia de uma vacina a ser possivelmente introduzida no Programa Nacional de Imunização (Cerqueira *et al.* 2007; Camara *et al.* 2003).

O HPV-16 é, mundialmente, o genótipo de alto risco mais prevalente, sendo detectado em mais de 50% de todas as lesões cervicais causadas por HPV (Sterling & Tyring 2001; Swan *et al.* 1999; LANL 1997; zur Hausen 1991). A Agência Internacional de Pesquisa sobre o câncer (IARC) divulgou, recentemente, resultados de uma análise sobre a distribuição mundial de genótipos de HPV em mulheres citologicamente normais. Entre as 15613 mulheres investigadas, o genótipo mais

comum foi o HPV-16, seguido pelos HPVs 42, 58, 31, 18, 56, 81, 35, 33 e 45 (Clifford *et al.* 2005).

Em metanálise recente sobre a prevalência do HPV entre 5578 mulheres HIV-positivas, foi observado que, entre aquelas sem anormalidades citológicas, os seis genótipos de alto risco mais comuns do HPV foram 16, 58, 18, 52, 31 e 33. Por outro lado, a análise das mulheres HIV-positivas com HSIL demonstrou uma probabilidade significativamente maior de infecção pelos genótipos 11, 18, 33, 51, 52, 53, 58 e 61 do HPV (Clifford *et al.* 2006).

Na Bahia, os genótipos mais prevalentes de HPV entre mulheres HIV-positivas foram 16, 52, 51, 56, 54, 33, 35 e 53 (Queiroz *et al.* 2004). Gonçalves e colaboradores (1999) detectaram os genótipos 16 e 18 em Santos (São Paulo), seguidos pelos HPVs 61 e 53 em 141 pacientes HIV-positivas. Em outro estudo conduzido em São Paulo, entre 208 pacientes HIV-positivas, o HPV-6 foi o mais prevalente, seguido pelos HPVs 51, 11, 18 e 16 (Levi *et al.* 2002a). No Distrito Federal, em estudo realizado entre mulheres HIV-negativas, o HPV-16 foi o mais prevalente (49,2%), seguido pelo HPV-58 (13,43%). Esse dado do DF é semelhante ao que foi relatado em estudos conduzidos nas regiões norte e nordeste do Brasil, na Espanha e em alguns países asiáticos e latino-americanos (Câmara *et al.* 2003; Touze *et al.* 2001; Lorenzato *et al.* 2000; Noronha *et al.* 1999). Os dados apresentados demonstram a grande variabilidade na distribuição dos genótipos do HPV entre diferentes localidades e entre diferentes populações de uma mesma região.

No trabalho ora apresentado, observamos 27 diferentes genótipos de HPV entre mulheres HIV-positivas do DF e Entorno: 16, 81, 52, 35, 53, 58, 62, 70, 33, 66, 18, 31, 56, 61, 71, 6b, 11, 39, 40, 54, 32, 59, 67, 68, 72, 85 e 102, em ordem decrescente de prevalência. O HPV-81 foi, juntamente com o HPV-16, o genótipo mais prevalente nesse estudo (12,2%). Em estudo sobre a distribuição mundial dos genótipos de HPV em mulheres citologicamente normais, conduzido por Clifford *et al.* (2005), o HPV-81 foi o segundo genótipo de baixo risco mais prevalente, encontrado em 6,2% das 1429 mulheres HPV-positivas. Nesse estudo, a prevalência do HPV-81 foi 7% nas amostras africanas, 5% nas asiáticas, 4% nas amostras da América do Sul e 2% nas europeias (Clifford *et al.* 2005).

No estudo conduzido na população HIV negativa do DF, por Câmara e colaboradores (2003), 13 genótipos de HPV foram encontrados (16, 58, 31, 53, 18, 33, 35, 52, 66, 81, 6, 11 e 71). Considerando-se que cerca de 30 genótipos de HPV podem

infectar a mucosa genital em humanos, a detecção de 27 genótipos diferentes entre as mulheres HIV+ do DF confirma, de acordo com o relatado na literatura, a maior variabilidade do HPV na população infectada por HIV (Clifford *et al.* 2006). Essas diferenças na prevalência dos genótipos de HPV podem estar relacionadas à complexa inter-relação geográfica e biológica entre os diferentes genótipos e variantes de HPV e fatores imunogenéticos do hospedeiro. Nesse sentido, estudos são necessários para verificar o risco epidemiológico de genótipos de HPV menos comuns, para identificar novos genótipos, subtipos e variantes e para monitorar a eventual dispersão de genótipos virais não usuais relacionados a programas de vacinação e/ou mobilidade populacional (Tornesello *et al.* 2006; Clifford *et al.* 2005).

**HPV x Idade.** A idade mediana de início da vida sexual é de cerca de 16 anos na maioria dos países. Após cinco anos do início da vida sexual, aproximadamente 50% das mulheres jovens já estão infectadas com no mínimo um dos 30 genótipos de HPV que infectam preferencialmente os órgãos genitais. Os resultados obtidos nesse trabalho mostram uma prevalência significativamente mais alta de HPV entre mulheres jovens HIV-positivas, o que está de acordo com o relatado na literatura, que indica que a incidência máxima da infecção por HPV ocorre em adultos jovens (Burd 2003; Stier 2003; Levi *et al.* 2002a).

Os adultos jovens sexualmente ativos representam a parcela da população com maior risco de adquirir HPV, conforme estudos epidemiológicos que mostram que a prevalência de infecção por HPV é mais alta entre mulheres jovens sexualmente ativas, indicando uma redução no risco após a idade de 30 anos. Dentre os fatores responsáveis pela redução no risco de infecção por HPV com o aumento da idade, podem-se citar as mudanças no comportamento sexual e uma possível alteração na resposta imune. Entretanto, um segundo pico de infecção por HPV em idades avançadas também é uma característica comum das descobertas epidemiológicas (Bosch *et al.* 2006; Trottier & Franco 2006).

**HPV x Laudo citopatológico.** Em estudo realizado nos Estados Unidos sobre a distribuição dos genótipos de HPV entre o espectro de categorias de citologia cervical, o DNA viral foi detectado em 27% das amostras sem lesão intraepitelial, em 89,5% das amostras com ASCUS, em 97,5% das amostras com LSIL e em 96,5% das amostras com HSIL. Trinta e sete genótipos diferentes de HPV foram identificados. Pôde-se concluir, nesse estudo, que a detecção de HPV de alto risco por PCR pode beneficiar o tratamento das pacientes (Evans *et al.* 2006). Essa correlação entre as pesquisas

epidemiológicas moleculares e os dados clínicos é extremamente importante, visto que os resultados referentes à prevalência e à variabilidade genética do HPV obtidos na população do DF foram repassados aos médicos dos serviços de saúde participantes. Dessa forma, esperamos contribuir no tratamento das mulheres incluídas no estudo, o que está associado a uma melhoria na qualidade de vida e também a uma potencial redução de custos para a saúde pública.

Na Suécia, de 1 milhão de testes de Papanicolau realizados por ano, cerca de 4% apresentam qualquer grau de anormalidade. Considerando-se as mulheres com atipias de baixo grau analisadas, 66% eram positivas para DNA do HPV, o que demonstra a importância da confirmação da infecção utilizando-se técnicas moleculares, mesmo em mulheres com laudos citopatológicos apenas sugestivos de infecção por HPV (Andersson *et al.* 2005). Na Itália, dentre 414 mulheres estudadas, as prevalências de infecção por HPV foram 19,7%, 63,4%, 80% e 81,5% entre pacientes com cérvix normal, lesão intraepitelial escamosa de baixo grau, de alto grau e carcinoma cervical, respectivamente. Um total de 31 genótipos de HPV foi identificado, sendo o HPV-16 o mais freqüente (Tornesello *et al.* 2006).

Recentemente, foi realizada uma meta-análise por revisão da literatura mundial entre 1995 e 2005 referente à prevalência e distribuição dos genótipos do HPV entre mulheres citologicamente normais. No geral, a prevalência do HPV entre as 157.879 mulheres incluídas foi 10,4%. Por região, as prevalências foram 22,1% na África, 20,4% na América Central e México, 12,3% na América do Sul, 11,3% na América do Norte, 8,1% na Europa e 8% na Ásia. Em todas as regiões, a prevalência do HPV foi mais alta em mulheres com menos de 35 anos de idade. Na África, Américas e Europa, um segundo pico de prevalência do HPV foi observado em mulheres com mais de 45 anos. Com base nessas estimativas, pôde-se concluir que cerca de 291 milhões de mulheres em todo o mundo possuem DNA do HPV, das quais 32% devem estar infectadas por HPV-16 ou HPV-18, ou ambos (de Sanjose *et al.* 2007).

Em estudo recente no Rio de Janeiro, Carvalho e colaboradores (2005) observaram que a prevalência geral de DNA do HPV foi de 50,1%, variando de 25% entre mulheres classificadas como normais no teste de Papanicolau para 100% entre mulheres com diagnóstico de HSIL. Diferenças estatisticamente significativas foram detectadas entre as porcentagens de indivíduos com infecção por HPV com cérvix normal versus HSIL. No estudo ora apresentado, observamos, na região central do Brasil (DF e Entorno), a presença de infecção por HPV entre 29,2% das mulheres sem



anormalidades no exame citopatológico e entre 89,7% das classificadas como portadoras de citologias cervicais alteradas, comprovando a prevalência significativamente maior de infecção por HPV entre mulheres com atipias cervicais ( $p < 0,0001$ ). A positividade para DNA do HPV foi 50% entre as portadoras de ASCUS, 90,5% entre as mulheres com LSIL e 100% entre as com HSIL.

A presença de DNA do HPV entre amostras cervicais normais pode caracterizar infecções latentes ou lesões cervicais incipientes, caracterizando um baixo nível de replicação gênica do HPV e potencialmente um maior risco de desenvolvimento de lesão. Mesmo um único teste positivo para HPV em mulheres citologicamente normais pode prever o aparecimento de lesão subsequente. A positividade para DNA de HPV, quando a análise citológica é normal, determina a necessidade de um melhor acompanhamento clínico da paciente, sendo importante um monitoramento cervical mais freqüente para detecção precoce de lesões cervicais. Além disso, fatores ambientais e imunológicos do hospedeiro podem ter um papel importante no desenvolvimento de lesões cervicais. A história natural de uma infecção genital por HPV, incluindo os genótipos e a carga viral do HPV ao longo do tempo, pode influenciar o risco de lesão, bem como sua tendência de regredir, persistir ou progredir (Kjaer *et al.* 2006; Carvalho *et al.* 2005).

É importante salientar a prevalência elevada de infecção por HPV (29,2%) entre as mulheres infectadas por HIV e citologicamente normais no DF e Entorno. Na literatura, conforme previamente relatado, as taxas de positividade para HPV entre mulheres sem anormalidades cervicais variam de acordo com as características populacionais. No entanto, de um modo geral, na América do Sul, foi relatada uma prevalência de 12,3% de DNA do HPV entre mulheres com citologia cervical normal (de Sanjose *et al.* 2007). Já entre mulheres HIV-positivas citologicamente normais, a prevalência do HPV costuma ser mais alta, conforme Clifford *et al.* (2006), que relataram uma prevalência de 36,3% de DNA do HPV nessa população. Dessa forma, os resultados aqui obtidos confirmam uma maior prevalência de infecção por HPV entre mulheres infectadas por HIV, mesmo na ausência de anormalidades cervicais. A presença de infecção por HPV em mulheres citologicamente normais evidencia a necessidade de acompanhamento dessa população, pois as neoplasias cervicais em mulheres HIV positivas devem ser precocemente diagnosticadas para prevenir a progressão dessas lesões. O câncer invasivo nessas pacientes imunodeprimidas tem

comportamento mais agressivo, responde mal às terapias preconizadas e, na recorrência, é de pior prognóstico (de Souza *et al.* 2001).

Por outro lado, a presença de amostras negativas para HPV entre mulheres com laudos citopatológicos apresentando atipias celulares pode ser explicada pelo fato de que, segundo as diretrizes da Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia Cervical (ASCCP), da perspectiva de triagem de câncer de colo do útero, um resultado de exame citopatológico alterado com teste negativo para DNA de HPV representa, na maioria das vezes, um resultado falso-positivo. O exame de Papanicolau é apenas um recurso de triagem, cuja sensibilidade é de 70%, e as anormalidades detectadas por ele requerem uma avaliação definitiva por colposcopia e biópsia (Cox & American Society for Colposcopy and Cervical Pathology 2003).

**Variantes do HPV.** A caracterização molecular de isolados do HPV pode contribuir para entendermos melhor a associação de alguns variantes com uma oncogenicidade potencialmente maior. O estudo da variabilidade do HPV é o método mais sensível para a verificação das diferentes formas genéticas desse vírus e para o estudo da origem e propagação dos diversos variantes nas áreas geográficas. Esse estudo também pode informar sobre as características biológicas de linhagens com relação à patogenicidade e à transmissão, além de ter potenciais implicações para o desenvolvimento e eficácia de uma vacina. O conhecimento da prevalência dos diferentes variantes do HPV pode ser relevante para o manejo clínico do paciente e para comprovar a validade de testes de diagnóstico e de marcadores laboratoriais da infecção (Tornesello *et al.* 2007; Sichero & Villa 2006).

Em estudo recente sobre variantes dos HPVs 16 e 18, foi observado um maior risco de neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau associado aos variantes Africano-2 (Af-2) e Asiático-Americano (AA) do HPV-16 comparados aos Europeus (E). Com relação aos variantes do HPV-18, foi observado maior risco de lesão de alto grau associado aos variantes E e AA comparados aos Af (Xi *et al.* 2007). Sichero e colaboradores (2007) relataram que infecções por variantes E do HPV-18 foram significativamente mais prováveis de persistir. Na verdade, a variação dos potenciais oncogênicos de variantes dos HPVs 16 e 18 é sugerida por estudos *in vitro* que mostram que os variantes diferem em suas habilidades de induzir a degradação de p53, a diferenciação de queratinócitos e a transcrição relacionada à E2 e que os variantes AA, quando comparados aos E, possuem fortes atividades promotoras que dirigem a

transcrição dos oncogenes E6/E7. Em consonância com essas observações, os variantes AA do HPV-18, comparados aos Af, apresentaram uma maior habilidade em induzir a formação de tumores *in vivo*. Assim, é possível que algumas trocas nucleotídicas possam alterar diretamente os potenciais oncogênicos dos variantes e possam ser responsáveis pelas diferenças associadas ao risco de desenvolvimento de tumor observadas entre eles (Xi *et al.* 2007).

Para o HPV-18, foi sugerido que os variantes diferem na patogênese do câncer cervical e que pequenas diferenças genômicas no DNA viral têm impacto substancial na progressão dessa doença (de Boer *et al.* 2005). A região não codificadora do genoma do HPV-18, LCR, contém um grande número de elementos responsivos que controlam sua expressão gênica e replicação. As propriedades de transformação e imortalização estão relacionadas a esse segmento genômico, sendo possível que variações nucleotídicas na região LCR-E6 possam afetar as propriedades oncogênica e de transformação do HPV-18 (Arias-Pulido *et al.* 2005). A alteração na posição 41 do genoma do HPV-18, presente na amostra Bsb-48, está localizada no sítio de ligação para o fator celular de transcrição Sp-1 e é comumente detectada em amostras obtidas a partir de australianos. Foi observado que não apenas a ligação de Sp-1 é maior em isolados com a seqüência alterada, mas a atividade transcricional também é maior (Sichero *et al.* 2005). Sp1 é um ativador importante de promotores dependentes da RNA polimerase II, atuando como um elemento acessório na replicação dos papilomavírus (Rose *et al.* 1998).

Em estudo recente, foi verificado que variações nos nucleotídeos 41 (observada no isolado Bsb-48) e 104 (observada nos isolados Bsb-27, Bsb-48 e Bsb-206) estavam associadas a maior atividade do promotor de E6/E7, por modular os fatores de transcrição Sp1 e YY1. Além disso, também foi verificado que indivíduos com a mutação T104C apresentavam menor probabilidade de recorrência de tumor que indivíduos com a seqüência de referência (Arias-Pulido *et al.* 2005).

As mutações T7651C e A7658C, identificadas na amostra Bsb-82, estão localizadas no sítio de ligação do fator de transcrição específico de queratinócitos, KRF-1, o qual pode ligar-se a AP-1 para ativação transcricional. Na literatura, foi demonstrado que KRF-1 contribui fortemente para a atividade do *enhancer* constitutivo do HPV-18 em células epiteliais (Butz & Hoppe-Seyler 1993; Mack & Laimins 1991).

A mutação no nucleotídeo C7726T, presente no isolado Bsb-82, está localizada em posição correspondente ao sítio de ligação do fator Oct-1 (Morris *et al.* 1993). Oct-1 é um fator que regula um grande número de genes virais e celulares. Nos

níveis fisiológicos presentes em células epiteliais, Oct-1 ativa o *enhancer* do HPV por ligação a um elemento regulatório conservado presente na extremidade 3' do *enhancer*. Oct-1 parece não ativar o *enhancer* diretamente, mas o faz por estabilizar a ligação de NF1, o que, por sua vez, resulta em níveis mais altos de atividade do *enhancer* (O'Connor *et al.* 1995).

O segmento 5' da LCR contém uma região de ligação à matriz, localizada entre os nucleotídeos 7150 e 7450 e que possui função crítica na modulação da transcrição do HPV (Arias-Pulido *et al.* 2005). Dessa forma, as mutações A7180C (Bsb-206), T7258A (Bsb-82), A7323G (Bsb-82) e C7413T (Bsb-27), encontradas nessa região, interferem potencialmente na transcrição do genoma viral.

Apesar de podermos sugerir que as variações nucleotídicas observadas na LCR do HPV-18 possam afetar o funcionamento dessa região e, assim, afetar a atividade biológica do variante, não podemos concluir, pelos dados aqui apresentados, que essas mutações tenham efeito sobre o desenvolvimento de lesões cervicais. A análise da expressão gênica deve ser empregada para que se possa compreender melhor a oncogenicidade de variantes do HPV, tentando-se estabelecer relações entre substituições nucleotídicas na LCR e um aumento no potencial de malignidade (Kämmer *et al.* 2000, Tornesello *et al.* 2000).

A análise do gene E6 dos variantes de HPV-18 revelou apenas uma alteração de aminoácido (N129K) no isolado Bsb-82. Essa variação, que também estava presente em todos os variantes Af do HPV-18 em estudo anterior (de Boer *et al.* 2005), pode resultar em mudanças nas funções oncogênicas de E6, visto que a posição 129 é bastante conservada entre os HPVs oncogênicos. No entanto, análises *in vitro* demonstraram que essa mudança em E6 não afeta sua habilidade em promover a degradação de p53. Apesar de essa ser uma das interações mais importantes de E6, não se pode desconsiderar a existência de múltiplos alvos de E6, que também poderiam ser afetados, visto que E6 liga-se a diversas proteínas que regulam a proliferação celular. É importante destacar que mutações na sequência de aminoácidos podem alterar a habilidade da proteína em interagir com proteínas celulares e promover a transformação. Estudo recente sugeriu que mudanças nucleotídicas presentes em E6 de variantes Af podem promover seu *splicing* alternativo, reduzindo os níveis da proteína E6 funcional (Nominé *et al.* 2006; de la Cruz-Hernández *et al.* 2005). Resultados de estudos realizados principalmente para o HPV-16 demonstram que variações de aminoácidos no gene E6 podem alterar atividades da proteína importantes para seu potencial

carcinogênico (Lichtig *et al.* 2006). Arias-Pulido e colaboradores (2005) observaram uma menor variabilidade nucleotídica do gene E6 do HPV-18 quando comparado ao HPV-16. Essa diferença entre os genótipos virais pode explicar, em parte, diferenças no comportamento biológico desses vírus.

A seqüência de aminoácidos da proteína L1 é bastante conservada entre os HPVs. Dessa forma, a variabilidade genética observada no gene L1 pode estar associada ao fato de que esse gene codifica a principal proteína do capsídeo viral, a qual é alvo de respostas por anticorpos neutralizantes, que reagem quase exclusivamente com epitopos dependentes de conformação. Apesar do modelo para L1 do HPV postular que a região C-terminal está exposta na superfície viral devendo ser, conseqüentemente, altamente antigênica, a localização ou estrutura dos epitopos com os quais os anticorpos contra L1 reagem permanecem desconhecidas para a maioria dos HPVs, incluindo o HPV-18. As regiões hipervariáveis de L1 estão na superfície externa do pentâmero. Assim, um desafio seria determinar se variantes do HPV são relevantes no que diz respeito às vacinas contra esses vírus. Trocas de aminoácidos em alguns variantes podem estar localizadas em epitopos críticos para a resposta imune. Dessa forma, vacinas desenvolvidas contra um variante podem ter eficácia reduzida em países onde esses variantes sejam menos prevalentes. Além disso, os efeitos de variações de aminoácidos sobre outras vias da resposta imune durante a infecção natural devem ser considerados (Bishop *et al.* 2007; Sichero & Villa 2006; Arias-Pulido *et al.* 2005).

Para o gene L1, conforme relatado por Bishop e colaboradores (2007), as mutações observadas entre as amostras de HPV-18 do DF não estão localizadas em regiões da proteína responsáveis pela montagem do capsídeo viral. Por outro lado, a mutação na posição 149 de L1, detectada em todas as amostras de HPV-18 analisadas nesse estudo, está localizada próxima a um epitopo linear presente na superfície do capsídeo viral comum a muitos genótipos de HPV (Combata *et al.* 2002).

É esperado que a LCR apresente maior variabilidade, uma vez que é uma região não codificadora e que L1 apresente mais variações que E6, pois L1 codifica a principal proteína do capsídeo e, possivelmente, sofre pressão seletiva constante para o eficiente escape do sistema imune enquanto que o gene E6 codifica uma oncoproteína, que tem um papel importante na infecção e patogenicidade viral tendo, portanto, mais restrições a acumular e tolerar mutações.

Não foi estabelecida correlação entre os diferentes variantes de HPV-18 detectados e os resultados dos exames citopatológicos cervicais das amostras analisadas.

O isolado Bsb-82, único variante Af do HPV-18 detectado no DF, foi obtido a partir de amostra cervical citologicamente normal, confirmando os dados da literatura, que relatam que variantes Af do HPV-18 estão associados a um menor risco de desenvolvimento de lesão cervical (Xi *et al.* 2007). No entanto, os dados referentes aos variantes do HPV-18 ainda são controversos (Sichero *et al.* 2007). As variações nucleotídicas no HPV podem resultar em redução da patogenicidade do variante e podem surgir devido à pressão seletiva no indivíduo. Deve ser considerada a possibilidade de uma infecção recente por um determinado variante, o que determina a necessidade de acompanhamento da paciente quanto ao possível desenvolvimento de lesão cervical. Porém essas observações são apenas especulações devido ao pequeno número de amostras de HPV-18 obtidas neste estudo.

A análise filogenética do HPV-18 confirmou a filogenia descrita por Arias-Pulido e colaboradores em 2005 e bem estabelecida para o HPV-18, com os variantes agrupados em três clados filogenéticos principais: Europeu, Asiático-Americano e Africano. Pôde-se observar uma maior distância genética entre os variantes Af e os não-Af. Os clados E e AA formaram dois agrupamentos bastante relacionados e separados do clado Af, conforme previamente relatado (Arias-Pulido *et al.* 2005). Os resultados significativos dos testes de verossimilhança e a análise de distância genética confirmam o agrupamento das amostras Bsb-27, Bsb-48 e Bsb-206 no ramo E e da amostra Bsb-82 no ramo Af do HPV-18.

Entre os variantes de HPV estudados, tanto do genótipo 18 quanto dos genótipos 11, 33, 53, 59, 62, 66, 70, 81 e 102 (que tiveram o fragmento MY de L1 analisado), foram detectadas substituições não silenciosas e algumas estavam associadas a trocas não conservativas de aminoácidos. No caso dessas trocas não conservativas, há alteração das propriedades físico-químicas dos aminoácidos. No entanto, o efeito de cada mutação pontual na atividade da proteína depende da posição e função do aminoácido alterado, além da possível presença de outras variações no genoma. Mesmo que as trocas nucleotídicas provoquem mudanças significativas na conformação das proteínas codificadas, possivelmente não afetam negativamente o desempenho das mesmas, uma vez que sejam preservadas. A presença de diversas mutações nucleotídicas ainda não descritas na literatura entre os variantes dos HPVs 11, 33, 53, 59, 62, 66, 70, 81 e 102 pode ser explicada pelo fato de que esses genótipos virais não são tão estudados quanto os HPVs 16 e 18. Dessa forma, poucas seqüências referentes a

esses HPVs estão presentes no banco genômico, além de haver poucos estudos associados a esses vírus.

A especulação da relação entre as alterações nucleotídicas observadas em isolados do DF e suas funções está além do escopo desse estudo, pois as conseqüências das variações de seqüência identificadas podem variar devido à presença de alterações em outras regiões genômicas.

**HPV x HIV.** A AIDS representa a principal causa de morte de adultos entre 20 e 50 anos em 15 países. O Brasil e o mundo continuam altamente vulneráveis ao HIV que, durante a próxima década, provavelmente será o maior determinante de mortalidade nesta faixa etária em praticamente todos os países do mundo (de Souza *et al.* 2001).

O HIV-1 é transmitido, normalmente, por contato sexual, e sua taxa de transmissão, principalmente heterossexual, continua a aumentar em todo o mundo. O co-fator mais importante no aumento da eficiência de transmissão do HIV é a presença de outras infecções transmitidas sexualmente (ITS). As ITSs aumentam a susceptibilidade à infecção por HIV devido à alteração da mucosa, às mudanças imunes e outros efeitos no trato genital e por causarem inflamação. Células inflamatórias, cuja função envolve o combate a microrganismos e agentes estranhos, são capazes de danificar os tecidos cervicais pela liberação extracelular de oxigênio ativado, enzimas e citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL)-1, fator de necrose tumoral (TNF) e IL-6. O aumento e persistência da inflamação ampliam a carga viral na uretra, sêmen e fluido cervical, contribuindo para a patogênese da doença pelo HIV (Behbahani *et al.* 2007).

Devido a seus efeitos sobre as células CD4+ e sobre a regulação das respostas imunes a uma variedade de antígenos, a infecção por HIV pode atenuar a resposta imune sistêmica ao HPV. Especula-se que, se houver um baixo número de células de memória HPV-específicas circulantes, então a imunidade HPV-específica pode ser particularmente vulnerável aos efeitos do HIV. Além disso, a imunidade HPV-específica pode não se recuperar totalmente após a resposta imune ser restaurada, o que pode explicar o efeito benéfico relativamente limitado da terapia anti-retroviral sobre as lesões associadas ao HPV (Palefsky 2006b).

A incidência de lesões cervicais de alto grau em mulheres HIV+ está relacionada ao seu estado imune, expresso pela contagem de células CD4. Em mulheres HIV+ não infectadas por HPV, estima-se uma incidência de 9% de lesão cervical para contagem de CD4 < 500 células/ $\mu$ l (incidência que não varia para CD4 < 200) e de 4%

para contagens de CD4 > 500 (incidência similar à encontrada em mulheres HIV negativas). Além disso, as mulheres HIV+, quando comparadas às HIV negativas, apresentam uma progressão mais rápida à lesão de alto grau após diagnóstico de uma alteração citológica cervical (Sirera *et al.* 2006). Consistente com essas observações, descobertas recentes também afirmam que mulheres HIV-positivas com contagem de CD4 > 500/ $\mu$ L não apresentam maior taxa de lesões intra-epiteliais escamosas que mulheres não infectadas por HIV (Zorrilla 2007).

Em 1993, foi estabelecido um estudo para investigar o impacto da infecção por HIV em mulheres nos Estados Unidos (*Women's Interagency HIV Study - WIHS*). Em um dos sub-estudos do WIHS, Palefsky e colaboradores (1999) observaram que a positividade do HIV, positividade do HPV, baixa contagem de células CD4 e elevado número de cópias de RNA do HIV estavam associados com a incidência de anormalidades citológicas. Na literatura, os relatos sobre o impacto do tratamento anti-retroviral sobre a história natural e tratamento de NIC são variados, provavelmente devido a diferenças no desenho e desenvolvimento do estudo, padrões de uso dos anti-retrovirais e populações estudadas. De forma geral, os dados sugerem que esses medicamentos têm um impacto positivo modesto sobre a história natural de NIC. Foi demonstrado que mulheres que recebem a terapia anti-retroviral têm uma menor incidência de HSIL e uma maior taxa de regressão dessas lesões para lesões de baixo grau. Entretanto, ainda não foi demonstrada uma redução na incidência de câncer cervical associada ao tratamento anti-retroviral (Palefsky 2006a).

Já foi relatado na literatura que o nível de RNA do HIV-1 no plasma está associado à presença de DNA do HPV em amostras cervicais e à detecção de anormalidades no exame citológico. No entanto, não é fácil selecionar marcadores que possam ser usados para identificar um subgrupo de mulheres HIV-positivas que tenha maior probabilidade de apresentar infecção concomitante por HPV. Diversos fatores epidemiológicos são comuns a todas as mulheres infectadas por HIV e não podem ser usados para caracterizar aquelas em risco particularmente alto de infecção por HPV e de doença cervical. Entretanto, como o HPV é, pelo menos em parte, um patógeno oportunista nesse cenário, então marcadores laboratoriais da severidade da doença por HIV podem ajudar a prever doenças associadas ao HPV, como tem ocorrido para diversas outras enfermidades causadas por bactérias, fungos, vírus e parasitas. Nesse sentido, também já foi demonstrado que contagens reduzidas de células CD4 em



pacientes infectadas por HIV estão associadas à doença cervical e a taxas mais altas de infecção por HPV (Luque *et al.* 1999).

Palefsky relatou que, entre 1778 mulheres HIV-positivas e 500 HIV-negativas, participantes do WIHS, a infecção por HPV foi observada entre 63% das HIV+ e 30% das HIV-negativas. Em análise dessa mesma coorte, o maior risco de infecção por HPV foi entre mulheres com contagem de CD4+ menor que 200/ $\mu$ L ou com carga viral superior a 100.000 cópias de RNA do HIV/mL. Além disso, 22% das mulheres HIV+ sexualmente inativas com CD4 < 200/ $\mu$ L também tiveram detecção de HPV, sugerindo que nessas mulheres houve reativação de uma infecção pré-existente por esse vírus (Palefsky 2006a).

No DF, as análises estatísticas sugeriram que as anormalidades citológicas estavam associadas ao nível de imunossupressão, mas não foi possível observar associação estatisticamente significativa entre a prevalência de infecção por HPV e a contagem de células CD4. Esses resultados sugerem que o estado de imunocompetência do hospedeiro pode ter algum papel na evolução das lesões cervicais. Os dados aqui encontrados estão de acordo com o relatado na literatura, que indica que a imunossupressão e o genótipo de HPV são os fatores de risco mais importantes para desenvolvimento de NIC. Petry *et al.* (1994) demonstraram que mulheres HIV positivas, com CD4+ abaixo de 200 células/ $\mu$ L, tiveram 16 vezes mais risco de desenvolver NIC.

Outra observação do estudo ora apresentado foi que a carga viral do HIV estava associada à ocorrência de anormalidades citológicas e à detecção de DNA do HPV. A análise do uso de drogas anti-retrovirais não demonstrou uma associação significativa com a presença de HPV ou de anormalidades citológicas. Conforme relatado anteriormente, os dados da literatura ainda são bastante controversos com relação às associações entre marcadores da infecção por HIV e aspectos relacionados à infecção por HPV. Dessa forma, nossos resultados contribuem no aditamento aos dados já existentes, na tentativa de se determinar subgrupos específicos de indivíduos infectados por HIV e com maior risco de apresentar infecção por HPV e/ou suas lesões associadas.

De acordo com o Relatório de 2006 da UNAIDS, a resposta do Brasil à epidemia de AIDS continua a ser recomendável como exemplo a outros países. Nosso país possui amplo acesso ao tratamento, onde, em 2005, dos 209.000 brasileiros que precisavam de terapia anti-retroviral, cerca de 170.000 (81,3%) a estavam recebendo.

No entanto, o país também parece exemplificar uma tendência observada em outros países da América Latina: a infecção é crescente entre mulheres e esse aumento começou recentemente ([www.unaids.org](http://www.unaids.org)). Esses dados confirmam a necessidade do acompanhamento da população feminina HIV-positiva, principalmente com relação à presença de outras infecções, que podem encontrar maior facilidade de estabelecimento e evolução em hospedeiros imunodeficientes.

O presente estudo sugere que a infecção pelo HIV-1 e o imunocomprometimento associado influenciam na presença de infecção por HPV, que pode ser recém adquirida ou resultante de reativação de uma infecção latente, e de lesões precursoras do câncer do colo uterino. A utilização de técnicas de biologia molecular para a identificação e genotipagem do HPV é de fundamental importância no manejo clínico dessa população.

## CONCLUSÕES

❖ Sendo a infecção pelo HPV um fator precursor para o desenvolvimento do câncer cervical, a detecção do genoma viral pode ser utilizada como estratégia de vigilância para identificar mulheres portadoras de tipos oncogênicos de HPV, suscetíveis a instalação e progressão das lesões cervicais.

❖ A prevalência de infecção por HPV entre as mulheres infectadas por HIV-1 no Distrito Federal e Entorno foi de 41%.

❖ Foram observados 27 diferentes genótipos de HPV. Os HPVs -16 e -81 foram os mais prevalentes, seguidos pelos HPVs -52, 35, 53, 58, 62, 70, 33, 66, 18, 31, 56, 61, 71, 6b, 11, 39, 40, 54, 32, 59, 67, 68, 72, 85 e 102.

❖ Dentre as 82 mulheres co-infectadas (HPV-HIV), 72% estavam infectadas por genótipos de HPV de alto risco oncogênico.

❖ A prevalência de anormalidades citopatológicas cervicais entre as mulheres infectadas por HIV-1 no Distrito Federal e Entorno foi de 19,5%.

❖ Entre as mulheres HIV-positivas sem anormalidades no exame citopatológico cervical 29,2% estavam infectadas por HPV.

❖ A prevalência de infecção por HPV entre as mulheres HIV-positivas portadoras de exames citopatológicos cervicais anormais foi de 89,7%, observando-se uma associação estatisticamente significativa entre a detecção de DNA do HPV e a presença de anormalidades cervicais.

❖ Foi observada uma associação estatisticamente significativa entre a infecção por HPV e a idade  $\leq 30$  anos.

❖ Foram encontrados 11 novos variantes dos HPVs 11, 33, 53, 59, 62, 66, 70, 81 e 102 na população estudada.

❖ Para o HPV-18, foram encontrados três variantes Europeus e 1 variante Africano, tendo sido observadas mutações nos sítios de ligação dos fatores de transcrição Sp1 e Oct-1.

❖ Foi observada uma associação estatisticamente significativa entre a presença de DNA do HPV e a carga viral elevada do HIV ( $> 30000$  cópias/mL).

❖ Foi observada uma associação estatisticamente significativa entre a presença de anormalidades citopatológicas cervicais e a carga viral elevada do HIV ( $> 30000$  cópias/mL).

❖ Não foi observada associação estatisticamente significativa entre a presença de DNA do HPV e a imunodeficiência provocada pela infecção por HIV (< 200 células T CD4/ $\mu$ L).

❖ Foi observada associação estatisticamente significativa entre a presença de anormalidades citopatológicas cervicais e a imunodeficiência (< 200 células T CD4/ $\mu$ L).

❖ Não foi observada associação estatisticamente significativa entre o uso de anti-retrovirais e a detecção de DNA do HPV ou de anormalidades citopatológicas cervicais.

❖ Os resultados sobre a variabilidade genética do HPV, obtidos entre mulheres HIV-positivas no estudo ora apresentado, juntamente com os dados gerados a partir de amostras de mulheres HIV negativas (Câmara *et al.* 2003a), nos permitiram definir um perfil dos genótipos do HPV que ocorrem na região central do país – Distrito Federal e Entorno. Com esses resultados, esperamos contribuir para um melhor entendimento da variabilidade genética do HPV em nossa região, o que certamente terá implicações em futuros testes de vacinas no Brasil.

❖ A prevalência de infecção por HPV e os genótipos virais observados devem ser considerados para a terapêutica das pacientes, visando melhorar e ampliar a sobrevivência desses indivíduos e, também, reduzir custos para a saúde pública. Além disso, esses dados também devem ser considerados para o desenvolvimento e utilização das vacinas contra HPV.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

- Caracterizar as regiões LCR, E6 e L1 dos isolados de HPV-81, o genótipo de baixo risco mais freqüente nesse estudo;
- Caracterizar as regiões LCR, E6 e L1 dos isolados de HPV-16, o genótipo de alto risco mais freqüente nesse estudo;
- Comparar os resultados obtidos a partir das amostras de pacientes infectadas por HIV com os obtidos a partir das amostras de pacientes HIV negativas da mesma região (DF e Entorno).

Além disso, com o término das análises dos variantes dos HPVs 16 e 81, temos o intuito de submeter esses dados para publicação, juntamente com os resultados obtidos a partir de uma dissertação de Mestrado e uma tese de Doutorado, nas quais estão sendo analisados os variantes dos genótipos de HPV de alto risco encontrados no DF e Entorno.

Os dados aqui obtidos foram publicados no periódico *Archives of Virology* (anexo I) e submetidos para publicação no Periódico Comunicação em Ciências da Saúde (antiga Revista de Saúde do DF) (anexo II), o que visa a divulgação dos resultados entre os profissionais de saúde da região estudada, com vistas a auxiliar na terapêutica das pacientes e a melhorar a saúde pública no Distrito Federal. Além disso, um manuscrito referente aos variantes de HPV-18 encontrados no DF está em fase final de elaboração e deverá ser submetido para publicação no periódico *Virus Genes* até outubro/2007.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AHDIEH L, KLEIN RS, BURK R, CU-UVIN S, SCHUMAN P, DUERR A, SAFAEIAN M, ASTEMBORSKI J, DANIEL R, SHAH K. 2001. Prevalence, Incidence, and Type-Specific Persistence of Human Papillomavirus in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Positive and HIV-Negative Women. *The Journal of Infectious Diseases*, 184: 682-90.
- ALENCAR TR, CERQUEIRA DM, CRUZ MR, WYANT PS, RAMALHO ED, MARTINS CR. 2007. New HPV-16 European and non-European variants in Central Brazil. *Virus Genes*, 35(1): 1-4.
- ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHÄFFER AA, ZHANG J, ZHANG Z, MILLER W, LIPMAN DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25: 3389-3402.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts and figures 2007. Atlanta: American Cancer Society. Disponível em: <http://www.cancer.org/downloads>.
- ANDERSSON S, DILLNER L, ELFGREN K, MINTS M, PERSSON M, RYLANDER E. 2005. A comparison of the human papillomavirus test and Papanicolaou smear as a second screening method for women with minor cytological abnormalities. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 84(10): 996-1000.
- ANGEL P, SZABOWSKI A, SCHORPP-KISTNER M. 2001. Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene*, 20(19): 2413-23.
- APT D, CHONG T, LIU Y, BERNARD H-U. 1993. Nuclear factor I and epithelial cell-specific transcription of human papillomavirus type 16. *J Virol*, 67: 4455-4463.
- ARENDS MJ, DONALDSON YK, DUVALL E, WYLLIE AH, BIRD CC. 1993. Human papillomavirus type 18 associates with more advanced cervical neoplasia than human papillomavirus type 16. *Hum Pathol*, 24(4): 432-7.
- ARIAS-PULIDO H, PEYTON CL, TORREZ-MARTINEZ N, ANDERSON DN, WHEELER CM. 2005. Human papillomavirus type 18 variant lineages in United States populations characterized by sequence analysis of LCR-E6, E2, and L1 regions. *Virology*, 338(1): 22-34.

- BANNISTER AJ, KOUZARIDES T. 1996. The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature*, 384(6610): 641-3.
- BASEMAN JG, KOUTSKY LA. 2005. The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of Clinical Virology*, 32S: S16-S24.
- BAUKNECHT T, SHI Y. 1998. Overexpression of C/EBPbeta Represses Human Papillomavirus Type 18 Upstream Regulatory Region Activity in HeLa Cells by Interfering with the Binding of TATA-Binding Protein. *J Virol*, 72: 2113 - 2124.
- BAUKNECHT T, JUNDT F, HERR I, OEHLER T, DELIUS H, SHI Y, ANGEL P, ZUR HAUSEN H. 1995. A switch region determines the cell type-specific positive or negative action of YY1 on the activity of the human papillomavirus type 18 promoter. *J Virol*, 69(1): 1-12.
- BAUKNECHT T, ANGEL P, ROYER HD, ZUR HAUSEN H. 1992. Identification of a negative regulatory domain in the human papillomavirus type 18 promoter: interaction with the transcriptional repressor YY1. *EMBO J*, 11(12): 4607-17.
- BEDELL MA, HUDSON JB, GOLUB TR, TURYK ME, HOSKEN M, WILBANKS GN, LAIMINS LA. 1991. Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation. *Journal of Virology*, 65: 2254-2260.
- BEHBAHANI H, WALTHER-JALLOW L, KLARESKOG E, BAUM L, FRENCH AL, PATTERSON BK, GARCIA KP, SPETZ A-L, LANDAY A, ANDERSSON J. 2007. Proinflammatory and Type 1 Cytokine Expression Cervical Mucosa During HIV-1 and Human Papillomavirus Infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 45(1): 9-19.
- BENISTON RG, CAMPO MS. 2005. HPV-18 transformed cells fail to arrest in G1 in response to quercetin treatment. *Virus Res*, 109(2): 203-9.
- BEREZNEY R, MORTILLARO MJ, MA H, WEI X, SAMARABANDU J. 1995. The nuclear matrix: a structural milieu for genomic function. *Int Rev Cytol*, 162A: 1-65.
- BERNARD HU. 2005. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol*, 32: S1-6.

- BERNARD HU, CALLEJA-MACIAS IE, DUNN ST. 2005. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer*, 118(5): 1071-6.
- BERNARD HU. 2002. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *Ant Ther*, 7: 219–237.
- BERNARD HU, CHAN SY, MANOS MM, ONG CK, VILLA LL, DELIUS H, PEYTON DL, BAUER H M, WHELLER CM. 1994. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis*, 170: 1077-1085.
- BISHOP B, DASGUPTA J, CHEN XS. 2007. Structure-based engineering of papillomavirus major capsid 11: controlling particle assembly. *Virology Journal*, 4:3.
- de BOER MA, PETERS LA, AZIZ MF, SIREGAR B, CORNAIN S, VREDE MA, JORDANOVA ES, FLEUREN GJ. 2005. Human papillomavirus type 18 variants: histopathology and E6/E7 polymorphisms in three countries. *Int J Câncer*, 114(3): 422-5.
- de BOER MA, PETERS LA, AZIZ MF, SIREGAR B, CORNAIN S, VREDE MA, JORDANOVA ES, KOLKMAN-ULJEE S, FLEUREN GJ. 2004. Human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and The Netherlands. *Gynecol Oncol*, 94(2): 488-94.
- BOHL J, HULL B, VANDE POL SB. 2001. Cooperative transformation and coexpression of bovine papillomavirus type 1 E5 and E7 proteins. *J Virol*, 75(1): 513-21.
- BOSCH FX, QIAO Y-L, CASTELLSAGUÉ X. 2006. The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 94 (Supplement 1): S8-S21.
- BOUALLAGA I, MASSICARD S, YANIV M, THIERRY F. 2000. An enhanceosome containing the Jun B/Fra-2 heterodimer and the HMG-I(Y) architectural protein controls HPV 18 transcription. *EMBO Rep*, 1(5): 422-7.
- BURCHELL AN, WINER RL, DE SANJOSE S, FRANCO EL. 2006. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine*, 24S3: S3/52–S3/61.



- BURD EM. 2003. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiology reviews*, 16(1): 1-17.
- BUTZ K, HOPPE-SEYLER F. 1993. Transcriptional Control of Human Papillomavirus (HPV) Oncogene Expression: Composition of the HPV Type 18 Upstream Regulatory Region. *Journal of Virology*, 67(11): 6476-6486.
- CALLEJA-MACIAS IE, VILLA LL, PRADO JC, KALANTARI M, ALLAN B, WILLIAMSON AL, CHUNG LP, COLLINS RJ, ZUNA RE, DUNN ST, CHU TY, CUBIE HA, CUSCHIERI K, VON KNEBEL-DOEBERITZ M, MARTINS CR, SANCHEZ GI, BOSCH FX, MUNOZ N, BERNARD HU. 2005. Worldwide genomic diversity of the high-risk human papillomavirus types 31, 35, 52, and 58, four close relatives of human papillomavirus type 16. *J Virol*, 79(21): 13630-40.
- CAMARA GNNL, CERQUEIRA DM, OLIVEIRA APG, SILVA EO, BONFIM PR, CARVALHO LGS, MARTINS CRF. 2003. Prevalence of Human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions in Central Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(7): 879-883.
- CAMARA GNNL, CERQUEIRA DM, NEVES D, SILVA EO, CARVALHO LGS, MARTINS CRF. 2001. Caracterização Molecular dos Papilomavírus Humanos em Mulheres com Lesão do Colo Uterino, em Brasília, DF. *Revista de Saúde do Distrito Federal*, 12(3): 39-46.
- CARVALHO MO, CARESTIATO FN, PERDIGÃO PH, XAVIER MP, SILVA K, BOTELHO MO, OLIVEIRA LH, CAVALCANTI SM. 2005. Human papillomavirus infection in Rio de Janeiro, Brazil: a retrospective study. *Braz J Infect Dis*, 9(5): 398-404.
- CERQUEIRA DM, DE S MORAES D, CAMARA GN, AMARAL FA, OYAMA CN, DOS SANTOS MQ, MARTINS CR. 2007. High HPV genetic diversity in women infected with HIV-1 in Brazil. *Arch Virol*, 152(1): 75-83.
- CERQUEIRA DM, CAMARA GNN, CRUZ MR, SILVA EO, BRÍGIDO MM, CARVALHO LGS, MARTINS CRF. 2003. Variants of Human Papillomavirus Types 53, 58 and 66 Identified in Central Brazil. *Virus Genes*, 26(1): 83-87.
- CHAN S-Y, HO L, ONG CK, CHOW V, DRESCHER B, DÜRST M, MEULER J TER, VILLA LL, LUANDE J, MGAYA HN, BERNARD HU. 1992.

- Molecular variants of human papillomavirus-16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its co-evolution with humankind. *J Virol*, 66: 2057–2066.
- CHAN WK, KLOCK G, BERNARD HU. 1989. Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *J Virol*, 63: 3261–3269.
- CHATURVEDI AK, DUMESTRE J, GAFFGA AM, MIRE KM, CLARK RA, BRALY PS, DUNLAP K, BECKEL TE, HAMMONS AF, KISSINGER PJ, HAGENSEE ME. 2005. Prevalence of human papillomavirus genotypes in women from three clinical settings. *J Med Virol*, 75: 105–113.
- CHATURVEDI AK, BRINKMAN JA, GAFFGA AM, DUMESTRE J, CLARK RA, BRALY PS, DUNLAP K, KISSINGER PJ, HAGENSEE ME. 2004. Distribution of human papillomavirus type 16 variants in human immunodeficiency virus type 1-positive and -negative women. *J Gen Virol*, 85(Pt 5): 1237-41.
- CHEN JJ, REID CE, BAND V, ANDROPHY EJ. 1995. Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. *Science*, 269(5223): 529-31.
- CHONG T, APT D, GLOSS B, ISA M, BERNARD HU. 1991. The enhancer of human papillomavirus type 16: binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1, and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription. *J Virol*, 65(11): 5933-43.
- CHOW LT, BROKER TR. 1997. Small DNA tumor viruses. Chapter 12: 267-301 *In*: Nathanson N. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- CIECHANOVER A. 1994. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mechanisms of action and cellular physiology. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 375(9): 565-81.
- CLARKE B, CHETTY R. 2002. Postmodern cancer: the role of human immunodeficiency virus in uterine cervical cancer. *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 55: 19-24.
- CLIFFORD GM, GONÇALVES MAG, FRANCESCHI S for the HPV and HIV Study Group. 2006. Human papillomavirus types among women infected with HIV: a meta-analysis. *AIDS*, 20: 2337–2344.

- CLIFFORD GM, GALLUS S, HERRERO R, MUÑOZ N, SNIJDERS PJF, VACCARELLA S, ANH PTH, FERRECCIO C, HIEU NT, MATOS E, MOLANO M, RAJKUMAR R, RONCO G, DE SANJOSÉ S, SHIN HR, SUKVIRACH S, THOMAS JO, TUNSAKUL S, MEIJER CJLM, FRANCESCHI S, THE IARC HPV PREVALENCE SURVEYS STUDY GROUP. 2005. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet*, 366: 991–98.
- COLE ST, DANOS O. 1987. Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *J Mol Biol*, 193(4): 599-608.
- COMBITA A-L, TOUZÉ A, BOUSARGHIN L, CHRISTENSEN ND, COURSAGET P. 2002. Identification of Two Cross-Neutralizing Linear Epitopes within the L1 Major Capsid Protein of Human Papillomaviruses. *Journal of Virology*, 76(13): 6480–6486.
- CONGER KL, LIU JS, KUO SR, CHOW LT, WANG TS. 1999. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase. *J Biol Chem*, 274(5): 2696-705.
- COX JT, AMERICAN SOCIETY FOR COLPOSCOPY AND CERVICAL PATHOLOGY. 2003. The clinician's view: role of human papillomavirus testing in the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology Guidelines for the management of abnormal cervical cytology and cervical cancer precursors. *Arch Pathol Lab Med*, 127(8): 950-8.
- DE LA CRUZ-HERNÁNDEZ E, GARCÍA-CARRANCÁ A, MOHAR-BETANCOURT A, DUEÑAS-GONZÁLEZ A, CONTRERAS-PAREDES A, PÉREZ-CARDENAS, HERRERA-GOEPFERT R, LIZANO-SOBERÓN . 2005. Differential splicing of E6 within human papillomavirus type 18 variants and functional consequences. *Journal of General Virology*, 86: 2459–2468.
- CRIFE TP, HAUGEN TH, TURK JP, TABATABAI F, SCHMID PG, DURST M, et al. 1987. Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-

- activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J*, 6(12): 3745-3753.
- CROOK T, TIDY JA, VOUSDEN KH. 1991. Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. *Cell*, 67(3): 547-56.
- CRUZ MR, CERQUEIRA DM, CRUZ WB, CAMARA GN, BRIGIDO MM, SILVA EO, CARVALHO LG, MARTINS CR. 2004. Prevalence of human papillomavirus type 16 variants in the Federal District, Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99(3): 281-2.
- CUSCHIERI KS, CUBIE HA. 2005. The role of human papillomavirus testing in cervical screening. *J Clin Virol*, 32: S34-42.
- DEL MISTRO A, CHIECO BIANCHI L. 2001. HPV-related neoplasias in HIV-infected individuals. *Eur J Cancer*, 37(10): 1227-35.
- DELIUS H, SAEGLING B, BERGMANN K, SHAMANIN V, DE VILLIERS EM. 1998. The genomes of three of four novel HPV types, defined by differences of their L1 genes, show high conservation of the E7 gene and the URR. *Virology*, 240(2): 359-65.
- DERKAY CS, DARROW DH. 2000. Recurrent respiratory papillomatosis of the larynx: current diagnosis and treatment. *Otolaryngol Clin North Am*, 33(5): 1127-42.
- DONG XP, PFISTER H. 1999. Overlapping YY1- and aberrant SP1-binding sites proximal to the early promoter of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol*, 80: 2097-2101.
- DONG XP, STUBENRAUCH F, BEYER-FINKLER E, PFISTER H. 1994. Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV 16 DNA from cervical cancers. *Int J Cancer*, 58: 803-808.
- DOORBAR J. 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*, 110(5): 525-541.
- DOORBAR J. 2005. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*, 32 Suppl 1: S7-S15.
- DOORBAR J, FOO C, COLEMAN N, MEDCALF L, HARTLEY O, PROSPERO T, NAPHTHINE S, STERLING J, WINTER G, GRIFFIN H. 1997. Characterization of events during the late stages of HPV16 infection in vivo using high-affinity synthetic Fabs to E4. *Virology*, 238(1): 40-52.

- DOORBAR J, CAMPBELL D, GRAND RJ, GALLIMORE PH. 1986. Identification of the human papilloma virus-1a E4 gene products. *EMBO J*, 5(2): 355-62.
- DURST M, GLITZ D, SCHNEIDER A, ZUR HAUSEN H. 1992. Human papillomavirus type 16 (HPV 16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by in situ hybridization. *Virology*, 189(1): 132-140.
- DYSON N P, HOWLEY M, MUNGER K, HARLOW E. 1989. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 243: 934-956.
- EVANS MF, ADAMSON CS, PAPILO JL, ST JOHN TL, LEIMAN G, COOPER K. 2006. Distribution of human papillomavirus types in ThinPrep Papanicolaou tests classified according to the Bethesda 2001 terminology and correlations with patient age and biopsy outcomes. *Cancer*, 106(5): 1054-64.
- FAUQUET CM, MAYO MA, MANILOFF J, DESSELBERGER U, BALL LA (eds). 2005. Academic Press, 1162 pp. Elsevier. *Virus Taxonomy: The Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*.
- FERENCZY A, COUtlÉE F, FRANCO E, HANKINS C. 2003. Human Papillomavirus and HIV coinfection and the risk of neoplasias of the lower genital tract: a review of recent developments. *CMAJ*, 169(5): 431-434.
- FRANCO EL, HARPER DM. 2005. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. *Vaccine*, 23(17-18): 2388-94.
- FU L, TERA I M, MATSUKURA T, HERRERO R, BURK RD. 2004. Codetection of a Mixed Population of candHPV62 Containing Wild-Type and Disrupted E1 Open-Reading Frame in a 45-Year-Old Woman with Normal Cytology. *J Infect Dis*, 190(7): 1303-1309.
- GALVIN KM, SHI Y. 1997. Multiple mechanisms of transcriptional repression by YY1. *Mol Cell Biol*, 17: 3723-3732.
- GAMBHIRA R, GRAVITT PE, BOSSIS I, STERN PL, VISCIDI RP, RODEN RB. 2006. Vaccination of healthy volunteers with human papillomavirus type 16 L2E7E6 fusion protein induces serum antibody that neutralizes across papillomavirus species. *Cancer Res*, 66(23): 11120-4.

- GARNETT TO, DUERKSEN-HUGHES PJ. 2006. Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins. *Arch Virol*, 151(12): 2321-35.
- GIROGLOU T, FLORIN L, SCHÄFER F, STREECK RE, SAPP M. 2001. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol*, 75(3): 1565-70.
- GISSMANN L, WOLNIK L, IKENBERG H, KOLDOVSKY U, SCHNURCH HG, ZUR HAUSEN H. 1983. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(2): 560-3.
- GISSMANN L, ZUR HAUSEN H. 1980. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (*Condylomata acuminata*). *Int J Cancer*, 25(5): 605-9.
- GISSMANN L, ZUR HAUSEN H. 1976. Human papilloma virus DNA: physical mapping and genetic heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci*, 73:1310-1313.
- GLOSS B, BERNARD HU. 1990. The E6/E7 promoter of human papillomavirus type 16 is activated in the absence of E2 proteins by a sequence-aberrant Sp1 distal element. *J Virol*, 64: 5577-5584.
- GLOSS B, BERNARD HU, SEEDORF K, KLOCK G. 1987. The upstream regulatory region of the human papilloma virus-16 contains an E2 protein-independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones. *EMBO J*, 6(12): 3735-3743.
- GONÇALVES MAG, MASSAD E, BURATTINI MN, VILLA L. 1999. Relationship between human papillomavirus (HPV) genotyping and genital neoplasia in HIV-positive patients of Santos City, São Paulo, Brazil. *Int J AIDS*, 10: 803-807.
- HAGENSEE ME, YAEGASHI N, GALLOWAY DA. 1993. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J Virol*, 67(1): 315-22.
- HARPER DM, FRANCO EL, WHEELER CM, MOSCICKI AB, ROMANOWSKI B, ROTELI-MARTINS CM, JENKINS D, SCHUIND A, COSTA CLEMENS SA, DUBIN G; HPV VACCINE STUDY GROUP. 2006. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet*, 367(9518): 1247-55.

- HARPER DM, FRANCO EL, WHEELER C, FERRIS DG, JENKINS D, SCHUIND A, ZAHAF T, INNIS B, NAUD P, DE CARVALHO NS, ROTELI-MARTINS CM, TEIXEIRA J, BLATTER MM, KORN AP, QUINT W, DUBIN G, GLAXOSMITHKLINE HPV VACCINE STUDY GROUP. 2004. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet*, 364(9447): 1757-65.
- HEBNER CM, LAIMINS LA. 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol*, 16(2): 83-97.
- HIGGINS GD, UZELIN DM, PHILLIPS GE, MCEVOY P, MARIN R, BURRELL CJ. 1992. Transcription patterns of human papillomavirus type 16 in genital intraepithelial neoplasia: evidence for promoter usage within the E7 open reading frame during epithelial differentiation. *J Gen Virol*, 73(Pt 8): 2047-57.
- HO GY, BURK RD, KLEIN S, KADISH AS, CHANG CJ, PALAN P, BASU J, TACHEZY R, LEWIS R, ROMNEY S. 1995. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst*, 87(18): 1365-71.
- HO H, CHAN SY, BURK RD, DAS BC, FUGINAGA K, ICENOGLE JP, KAHN T, KIVIAT N, LANCASTER W, MAVROMARA-NAZOS P, LABROPOULOU V, MITRANI-ROSENBAUM S, NORRILD B, PILLAI MR, STOERKER J, SYRJAENEN K, SYRJAENEN S, TAY SK, VILLA LL, WHEELER CM, WILLIAMSON AL, BERNARD HU. 1993. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol*, 67(11): 6413-6423.
- IHEKWEAZU C. 2006. Worldwide distribution of HPV types in women with normal cervical cytology and in women with cervical adenocarcinoma. *Euro Surveill*, 11(3): E060323.6.
- INCA. 2006. Disponível no endereço: <http://www.inca.gov.br/>.
- ISHIJI T, LACE MJ, PARKKINEN S, ANDERSON RD, HAUGEN TH, CRIPE TP, XIAO J-H, DAVIDSON I, CHAMBON P, TUREK LP. 1992. Transcriptional enhancer factor (TEF)-1 and its cell-specific co-activator

- activate h papillomavirus-16 E6 and E7 oncogene transcription in keratinocytes and cervical carcinoma cells. *EMBO J*, 11: 2271–2281.
- JO H, KIM JW. 2005. Implications of HPV infection in uterine cervical cancer. *Cancer Therapy*, 3: 419-434.
- JONES DL, MUNGER K. 1997. Analysis of the p53-mediated G1 growth arrest pathway in cells expressing the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J Virol*, 71(4): 2905-12.
- KÄMMER C, TOMMASINO M, SYRJÄNEN S, DELIUS H, HEBLING U, WARTHORST U, PFISTER H, ZEHBE I. 2002. Variants of the long control region and the E6 oncogene in European human papillomavirus type 16 isolates: implication for cervical disease. *Brit J Cancer*, 86: 269-273.
- KÄMMER C, WARTHORST U, TORREZ-MARTINEZ N, WHEELER CM, PFISTER H. 2000. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J Gen Virol*, 81: 1975-1981.
- KESSIS TD, SLEBOS RJ, NELSON WG, KASTAN MB, PLUNKETT BS, HAN SM, LORINCZ AT, HEDRICK L, CHO KR. 1993. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(9): 3988-92.
- KING LA, TASE T, TWIGGS LB, OKAGAKI T, SAVAGE JE, ADCOCK LL, PREM KA, CARSON LF. 1989. Prognostic significance of the presence of human papillomavirus DNA in patients with invasive carcinoma of the cervix. *Cancer*, 63(5): 897-900.
- KISSELJOV FL. 2000. Virus-associated human tumors: cervical carcinomas and papilloma viruses. *Biochemistry (Mosc)*, 65(1): 68-77.
- KJAER S, HOGDALL E, FREDERIKSEN K, MUNK C, VAN DEN BRULE A, SVARE E, MEIJER C, LORINCZ A, IFTNER T. 2006. The Absolute Risk of Cervical Abnormalities in High-risk Human Papillomavirus-Positive, Cytologically Normal Women Over a 10-Year Period. *Cancer Res*, 66(21): 10630-6.
- KLINGELHUTZ AJ, FOSTER SA, MCDOUGALL JK. 1996. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*, 380(6569): 79-82.



- KOTLOFF KL, WASSERMAN SS, RUSS K, SHAPIRO S, DANIEL R, BROWN W, FROST A, TABARA SO, SHAH K. 1998. Detection of genital human papillomavirus and associated cytological abnormalities among college women. *Sex Transm Dis*, 25(5): 243-50.
- KOUTSKY L. 1997. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med*, 102(5A): 3-8.
- KUMAR S, TAMURA K, NEI M. 2004. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment Briefings. *Bioinformatics*, 5: 150-163.
- LANL – Los Alamos National Laboratory, US 1997. Disponível na Internet: <http://hpv-web.lanl.gov>. HPV Sequence Database. HPV Compendium part I, p 1-7.
- LECHNER MS, LAIMINS LA. 1994. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol*, 68: 4262 - 4273.
- LEE K-Y, BROKER TR, CHOW LT. 1998. Transcription Factor YY1 Represses Cell-Free Replication from Human Papillomavirus Origins. *J Virol*, 72(6): 4911-4917.
- LEVI JE, FERNANDES S, TATENO AF, MOTTA E, LIMA LP, ELUF-NETO J, PANNUTI CS. 2004. Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. *Gynecol Oncol*, 92: 225-231.
- LEVI JE, KLETER B, QUINT WGV, FINK MCS, CANTO CLM, MATSUBARA R, LINHARES I, SEGURADO A, VANDERBORGHT B, NETO JE, van DOORN L-J. 2002. 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*, 40(9): 3341-3345.
- LEVI JE, FINK MCS, CANTO CLM, CARRETIERO N, MATSUBARA R, LINHARES I, DORES GB, CASTELO A, SEGURADO A, UIP DE, NETO JE. 2002. Human Papillomavirus Prevalence, Viral Load and Cervical Intraepithelial Neoplasia in HIV-Infected Women. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 6(3): 129-134.
- LI T-T, ZHAO L-N, LIU Z-G, HAN Y, FAN D-M. 2005. Regulation of apoptosis by the papillomavirus E6 oncogene. *World J Gastroenterol*, 11(7): 931-7.

- LICHTIG H, ALGRISI M, BOTZER LE, ABADI T, VERBITZKY Y, JACKMAN A, TOMMASINO M, ZEHBE I, SHERMAN L. 2006. HPV16 E6 natural variants exhibit different activities in functional assays relevant to the carcinogenic potential of E6. *Virology*, 350(1): 216-27.
- LIU JS, KUO SR, BROKER TR, CHOW LT. 1995. The functions of human papillomavirus type 11 E1, E2, and E2C proteins in cell-free DNA replication. *J Biol Chem*, 270(45): 27283-91.
- LIZANO M, BERUMEN J, GUIDO MC, CASAS L, GARCIA-CARRANCA A. 1997. Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*, 89: 1227-1231.
- LORENZATO F, HO L, TERRY G, SINGER A, SANTOS LC, DE LUCENA BATISTA R, LUBAMBO T. 2000. The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). *Int J Gynecol Cancer*, 10(2): 143-150.
- LUQUE AE, DEMETER LM, REICHMAN RC. 1999. Association of Human Papillomavirus Infection and Disease with Magnitude of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) RNA Plasma Level among Women with HIV-1 Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 179: 1405-1409.
- MACIAG PC, VILLA LL. 1999. Genetic susceptibility to HPV infection and cervical cancer. *Braz J Med Biol Res*, 32(7): 915-22.
- MACK DH, LAIMINS LA. 1991. A keratinocyte-specific transcription factor, KRF-1, interacts with AP-1 to activate expression of human papillomavirus type 18 in squamous epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9102-9106.
- MAHDAVI A, MONK BJ. 2005. Vaccines against human papillomavirus and cervical cancer: promises and challenges. *Oncologist*, 10(7): 528-38.
- MATSUKURA T, SUGASE M. 2001. Relationships between 80 human papillomavirus genotypes and different grades of cervical intraepithelial neoplasia: association and causality. *Virology*, 283(1): 139-47.
- MAY M, DONG X-P, BEYER-FINKLER E, STUBENRAUCH F, FUCHS PG, PFISTER H. 1994. The E6/E7 promoter of extrachromosomal HPV-16 DNA in cervical cancers escapes from cellular repression by mutation of target sequences for YY1. *EMBO J*, 13: 1460-1466.

- MCBRIDE AA, Romanczuk H, Howley PM. 1991. The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J Biol Chem*, 266: 18411 - 18414.
- MOHAN S, IND T. 2004. Cervical screening in England and Wales: an update. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 16: 491-6.
- MOLIJN A, KLETER B, QUINT W, VAN DOORN LJ. 2005. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol*, 32: S43-51.
- MOODLEY M, SEWART S, HERRINGTON CS, CHETTY R, PEGORARO R, MOODLEY J. 2003. The interaction between steroid hormones, human papillomavirus type 16, E6 oncogene expression, and cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 13(6): 834-42.
- MORENO V, BOSCH FX, MUNOZ N, MEIJER CJ, SHAH KV, WALBOOMERS JM, HERRERO R, FRANCESCHI S; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. MULTICENTRIC CERVICAL CANCER STUDY GROUP. 2002. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*, 359(9312): 1085-92.
- MORRIS PJ, DENT CL, RING CJ, LATCHMAN DS. 1993. The octamer binding site in the HPV16 regulatory region produces opposite effects on gene expression in cervical and non-cervical cells. *Nucleic Acids Res*, 21(4): 1019-23.
- MÜNGER K, HOWLEY PM. 2002. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*, 89(2): 213-28.
- MUNGER K, WERNESS BA, DYSON N, PHELPS WC, HARLOW E, HOWLEY PM. 1989. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J*, 8(13): 4099-105.
- MUNOZ N, CASTELLSAGUE X, DE GONZALEZ AB, GISSMANN L. 2006. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24(S3): S1-S10.
- MUNOZ N, BOSCH FX, DE SANJOSE S, SHAH KV. 1994. The role of HPV in the etiology of cervical cancer. *Mutat Res*, 305(2): 293-301.
- NARECHANIA A, CHEN Z, DESALLE R, BURK RD. 2005. Phylogenetic incongruence among oncogenic genital alpha human papillomaviruses. *J Virol*, 79(24): 15503-15510.

- NICOL AF; FERNANDES AT; BONECINI-ALMEIDA MDA G. 2005. Immune response in cervical dysplasia induced by human papillomavirus: the influence of human immunodeficiency virus-1 co-infection -- review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100(1): 1-12.
- NINDL I, RINDFLEISCH K, LOTZ B, SCHNEIDER A, DÜRST M. 1999. Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer. *Int J Cancer*, 82: 203-207.
- NOMINE Y, MASSON MURIELLE, CHARBONNIER S, ZANIER KATIA, RISTRANI T, DERYCKERE F, SIBLER A-P, DESPLANCQ D, ATKINSON RA, WEISS E, ORFANOUDAKIS G, KIEFFER B, TRAVE G. 2006. Structural and Functional Analysis of E6 Oncoprotein: Insights in the Molecular Pathways of Human Papillomavirus-Mediated Pathogenesis. *Molecular Cell*, 21: 665–678.
- NORONHA V, MELLO W, VILLA L, BRITO A, MACEDO R, BISI F, MOTA R, SASSAMOTO K, MONTEIRO T, LINHARES A. 1999. Human papillomavirus associated with uterine cervix lesions. *Rev Soc Bras Med Trop*, 32(3): 235-40.
- NYAGOL J, LEUCCI E, ONNIS A, DE FALCO G, TIGLI C, SANSEVERINO F, TORRICELLI M, PALUMMO N, PACENTI L, SANTOPIETRO R, SPINA D, GICHANGI P, MUCHIRI L, LAZZI S, PETRAGLIA F, LEONCINI L, GIORDANO A. 2006. The Effects of HIV-1 Tat Protein on Cell Cycle during Cervical Carcinogenesis. *Cancer Biol Ther*, 5(6): 684-90.
- O'CONNOR MJ, STUNKEL W, KOH CH, ZIMMERMANN H, BERNARD HU. 2000. The differentiation-specific factor CDP/Cut represses transcription and replication of human papillomaviruses through a conserved silencing element. *J Virol*, 74(1): 401-10.
- O'CONNOR MJ, STÜNKEL W, ZIMMERMANN H, KOH CH, BERNARD HU. 1998. A novel YY1-independent silencer represses the activity of the human papillomavirus type 16 enhancer. *J Virol*, 72(12): 10083-92.
- O'CONNOR MJ, TAN SH, TAN CH, BERNARD HU. 1996. YY1 represses human papillomavirus type 16 transcription by quenching AP-1 activity. *J Virol*, 70: 6529-6539.

- O'CONNOR M, CHAN S-Y, BERNARD HU. 1995. Transcription Factor Binding Sites in the Long Control Region of Genital HPVs. *Human Papillomaviruses 1995 Compendium*.
- ONG CK, CHAN SY, CAMPO MS, FUJINAGA K, MAVROMARA-NAZOS P, LABROPOULOU V, PFISTER H, TAY SK, TER MEULEN J, VILLA LL, *et al*. 1993. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol*, 67(11): 6424-31.
- PAAVONEN J, HALTTUNEN M, HANSSON BG, NIEMINEN P, ROSTILA T, LEHTINEN M. 2000. Prerequisites for human papillomavirus vaccine trial: results of feasibility studies. *J Clin Virol*, 19(1-2): 25-30.
- PAGE RDM. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357-358.
- PALEFSKY JM. 2006. HPV infection and HPV-associated neoplasia in immunocompromised women. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 94(Supplement 1): S56-S64.
- PALEFSKY J. 2006. Biology of HPV in HIV Infection. *Adv Dent Res*, 19: 99-105.
- PALEFSKY JM. 2000. Human papillomavirus-related tumors. *AIDS*, 14 Suppl 3: S189-95.
- PALEFSKY JM, MINKOFF H, KALISH LA, LEVINE A, SACKS HS, GARCIA P, YOUNG M, MELNICK S, MIOTTI P, BURK R. 1999. Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. *J Natl Cancer Inst*, 91: 226-236.
- PATER MM, PATER A. 1985. Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix. *Virology*, 145(2): 313-8.
- PATTISON S, SKALNIK DG, ROMAN A. 1997. CCAAT displacement protein, a regulator of differentiation-specific gene expression, binds a negative regulatory element within the 5' end of the human papillomavirus type 6 long control region. *J Virol*, 71(3): 2013-22.
- PETRY KU, SCHEFFEL D, BODE U, *et al*. 1994. Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions. *Int J Cancer*, 57:836-40.
- PEYTON CL, JANSEN AM, WHELLER CM, STEWART A-C, PETO J, BOSCH FX, MUÑOZ N, TEYSSIL A, TORROELLA M, WABINGA HR,

- NGELANGEL C, MANOS MM. 1994. A novel human papillomaviruses sequence from an international cervical cancer study. *J Infect Dis*, 170: 1093-1095.
- PHELPS WC, HOWLEY PM. 1987. Transcriptional trans-activation by the human papillomavirus type 16 E2 gene product. *J Virol*, 61(5): 1630-8.
- PILOTTI S, RILKE F, ALASIO L, FONTANELLI R. 1982. Histologic evidence for an association of cervical intraepithelial neoplasia with human papilloma virus infection. *Diagn Gynecol Obstet*, 4(4): 357-62.
- PINTO AP, BAGGIO HCC, GUEDES GB. 2005. Sexually-transmitted viral diseases in women: clinical and epidemiological aspects and advances in laboratory diagnosis. *Braz J Infect Dis*, 9(3): 241-50.
- POSADA D, CRANDALL KA. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14 (9): 817-818.
- PRAY TR, LAIMINS LA. 1995. Differentiation-dependent expression of E1--E4 proteins in cell lines maintaining episomes of human papillomavirus type 31b. *Virology*, 206(1): 679-85.
- QUEIROZ C, TRAVASSOS AG, STUDART E, FILHO JBA, SARNO CK, PINHEIRO CC. 2004. Prevalence of Human Papilloma Virus in HIV-Positive and HIV-Negative Patients in the State of Bahia. A Pilot Study. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 8(5): 356-362.
- ROSE B, STEGER G, DONG XP, THOMPSON C, COSSART Y, TATTERSALL M, PFISTER H. 1998. Point mutations in SP1 motifs in the upstream regulatory region of human papillomavirus type 18 isolates from cervical cancers increase promoter activity. *J Gen Virol*, 79: 1659 - 1663.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> edn. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- de SANJOSÉ S, DIAZ M, CASTELLSAGUÉ X, CLIFFORD G, BRUNI L, MUÑOZ N, BOSCH FX. 2007. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 7(7): 453-9.
- SANJOSÉ S, PALEFSKY J. 2002. Cervical and anal HPV infections in HIV positive women and men. *Virus Research*, 89: 201-211.
- de SANJOSE S, MUNOZ N, BOSCH FX, REIMANN K, PEDERSEN NS, ORFILA J, ASCUNCE N, GONZALEZ LC, TAFUR L, GILI M, et al. 1994.

- Sexually transmitted agents and cervical neoplasia in Colombia and Spain. *Int J Cancer*, 56(3): 358-63.
- SASLOW D, CASTLE PE, COX JT, DAVEY DD, EINSTEIN MH, FERRIS DG, GOLDIE SJ, HARPER DM, KINNEY W, MOSCICKI A-B, NOLLER KL, WHEELER CM, ADES T, ANDREWS KS, DOROSHENK MK, KAHN KG, SCHMIDT C, SHAFETY O, SMITH RA, PARTRIDGE EE, (FOR THE GYNECOLOGIC CANCER ADVISORY GROUP), GARCIA F. 2007. American Cancer Society Guideline for Human Papillomavirus (HPV) Vaccine Use to Prevent Cervical Cancer and Its Precursors. *CA Cancer J Clin*, 57: 7-28.
- SATHISH N, ABRAHAM P, PEEDICAYIL A, SRIDHARAN G, CHANDY G. 2005. HPV 16 E6 sequence variations in Indian patients with cervical neoplasia. *Cancer Letters* 229(1): 93-99.
- SCHIFFMAN MH, BRINTON LA. 1995. The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer*, 76(10 Suppl): 1888-1901.
- SCHLECHT NF, BURK RD, PALEFSKY JM, MINKOFF H, XUE X, MASSAD LS, BACON M, LEVINE AM, ANASTOS K, GANGE SJ, WATTS DH, DA COSTA MM, CHEN Z, BANG JY, FAZZARI M, HALL C, STRICKLER HD. 2005. Variants of human papillomaviruses 16 and 18 and their natural history in human immunodeficiency virus-positive women. *J Gen Virol*, 86(Pt 10): 2709-20.
- SCHMIDT M, KEDZIA W, GOŹDZICKA-JÓZEFIAK A. 2001. Intratype HPV16 sequence variation within LCR of isolates from asymptomatic carriers and cervical cancers. *J Clin Virol*, 23: 65-77.
- SCHNEIDER A. 1994. Natural history of genital papillomavirus infections. *Intervirology*, 37(3-4): 201-214.
- SCHWARTZ SM, DALING JR, SHERA KA, MADELEINE MM, MCKNIGHT B, GALLOWAY DA, PORTER PL, MCDUGALL JK. 2001. Human papillomavirus and prognosis of invasive cervical cancer: a population-based study. *J Clin Oncol*, 19(7): 1906-15.
- SETTLEMAN J, FAZELI A, MALICKI J, HORWITZ BH, DIMAIO D. 1989. Genetic evidence that acute morphologic transformation, induction of cellular DNA synthesis, and focus formation are mediated by a single activity of the bovine papillomavirus E5 protein. *Mol Cell Biol*, 9(12): 5563-72.

- SHIRASAWA H, TOMITA Y, KUBOTA K, KASAI T, SEKIYA S, TAKAMIZAWA H, SIMIZU B. 1986. Detection of human papillomavirus type 16 DNA and evidence for integration into the cell DNA in cervical dysplasia. *J Gen Virol*, 67( Pt 9): 2011-5.
- SICHERO L, FERREIRA S, TROTTIER H, DUARTE-FRANCO E, FERENCZY A, FRANCO EL, VILLA LL. 2007. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *Int J Cancer*, 120(8): 1763-8.
- SICHERO L, VILLA LL. 2006 Epidemiological and functional implications of molecular variants of human papillomavirus. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39: 707-717.
- SICHERO L, FRANCO EL, VILLA LL. 2005. Different P105 promoter activities among natural variants of human papillomavirus type 18. *J Infect Dis*, 191(5): 739-42.
- SIRERA G, VIDELA S, HERRANZ P., CORZO-DELGADO JE, POR EL GRUPO DE ESTUDIO DEL SIDA (GESIDA). 2006. Virus del papiloma humano y virus de la inmunodeficiencia humana/sida. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 24(Supl. 2): 40-7.
- SMITH JS, HERRERO R, BOSETTI C, MUNOZ N, BOSCH FX, ELUF-NETO J, CASTELLSAGUE X, MEIJER CJ, VAN DEN BRULE AJ, FRANCESCHI S, ASHLEY R; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) MULTICENTRIC CERVICAL CANCER STUDY GROUP. 2002. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*, 94(21): 1604-13.
- de SOUZA NST, do MELO VH, de CASTRO LPF. 2001. Diagnóstico da infecção pelo HPV em Lesões do Colo do Útero em Mulheres HIV+: Acuidade da Histopatologia. *Rev Bras Ginecol Obstet*, 23(6): 355-364.
- SPECK LM, TYRING SK. 2006. Vaccines for the prevention of human papillomavirus infections. *Skin Therapy Lett*, 11(6): 1-3.
- STEGER G, HAM J, YANIV M. 1996. E2 proteins: modulators of papillomavirus transcription and replication. *Methods Enzymol*, 274: 173-85.
- STERLING JC, TYRING SK. 2001. Human papillomaviruses: clinical and scientific advances. 1st ed. New York: Oxford University.



- STIER E. 2003. Cervical neoplasia and the HIV-infected patient. *Hematol Oncol Clin N Am*, 17: 873-887.
- STOLER MH, RHODES CR, WHITBECK A, WOLINSKY SM, CHOW LT, BROKER TR. 1992. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum. Pathol*, 23(2): 117-128.
- STOREY A, THOMAS M, KALITA A, HARWOOD C, GARDIOL D, MANTOVANI F, BREUER J, LEIGH IM, MATLASHEWSKI G, BANKS L. 1998. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature*, 393(6682): 229-34.
- STOREY A, PIM D, MURRAY A, OSBORN K, BANKS L, CRAWFORD L. 1988. Comparison of the in vitro transforming properties of human papillomavirus types. *EMBO J*, 7: 1815-1820.
- STRAIGHT SW, HINKLE PM, JEWERS RJ, MCCANCE DJ. 1993. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J Virol*, 67: 4521 - 4532.
- STUNKEL W, BERNARD HU. 1999. The chromatin structure of the long control region of human papillomavirus type 16 represses viral oncoprotein expression. *J Virol*, 73(3): 1918-30.
- SUBRAMANYAM D, KRISHNA S. 2006. c-Myc substitutes for Notch1-CBF1 functions in cooperative transformation with papillomavirus oncogenes. *Virology*, 347(1): 191-198.
- SWAN DC, TUCKER RA, TORTOLERO-LUNA G, MITCHELL MF, WIDEROFF L, UNGER ER, NISENBAUM RA, REEVES WC, ICENOGLE JP. 1999. Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J Clin Microbiol*, 37: 1030–1034.
- SWOFFORD D, OLSEN G, WADDELL P. 1996. Phylogenetic inference. In: D. Hillis (Ed.). *Molecular Systematics*. Massachusetts: Sunderland, 1996. Phylogenetic inference, p.407-514.
- SYRJANEN K, PARKKINEN S, MANTYJARVI R, VAYRYNEN M, SYRJANEN S, HOLOPAINEN H, SAARIKOSKI S, CASTREN O. 1985. Human papillomavirus (HPV) type as an important determinant of the natural history of HPV infections in uterine cervix. *Eur J Epidemiol*, 1(3): 180-7.

- TAN SH, BARTSCH D, SCHWARZ E, BERNARD HU. 1998. Nuclear matrix attachment regions of human papillomavirus type 16 point toward conservation of these genomic elements in all genital papillomaviruses. *J Virol*, 72(5): 3610-22.
- TAN SH, LEONG LE, WALKER PA, BERNARD HU. 1994. The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIID. *J Virol*, 68: 6411 - 6420.
- TAN SH, GLOSS B, BERNARD HU. 1992. During negative regulation of the human papillomavirus-16E6 promoter, the viral E2 protein can displace Sp1 from a proximal promoter element. *Nucleic Acids Res*, 20: 251-256.
- THIERRY F, HEARD JM, DARTMANN K, YANIV M. 1987. Characterization of a transcriptional promoter of human papillomavirus 18 and modulation of its expression by simian virus 40 and adenovirus early antigens. *J Virol*, 61(1): 134-42.
- THOMAS M, LAURA R, HEPNER K, GUCCIONE E, SAWYERS C, LASKY L, BANKS L. 2002. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene*, 21(33): 5088-96.
- THOMPSON J, HIGGINS D, GIBSON T. 1994. CUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res*, 22: 4673-4680.
- TORNESELLO ML, DURATURO ML, BUONAGURO L, VALLEFUOCO G, PICCOLI R, PALMIERI S, BUONAGURO FM. 2007. Prevalence of human papillomavirus genotypes and their variants in high risk West Africa women immigrants in South Italy. *Infectious Agents and Cancer*, 2:1.
- TORNESELLO ML, DURATURO ML, BOTTI G, GREGGI S, PICCOLI R, DE PALO G, MONTELLA M, BUONAGURO L, BUONAGURO FM. 2006. Prevalence of alpha-papillomavirus genotypes in cervical squamous intraepithelial lesions and invasive cervical carcinoma in the Italian population. *J Med Virol*, 78(12): 1663-72.
- TORRES VA, VIDAL GP. 2002. Possible role of transcription factor AP1 in the tissue-specific regulation of human papillomavirus. *Rev Invest Clin*, 54(3): 231-42.

- TOUZE A, DE SANJOSE S, COURSAGET P, ALMIRALL MR, PALACIO V, MEIJER CJL, KORNEGAY J, BOSCH FX. 2001. Prevalence of anti-human papillomavirus type 16, 18, 31 and 58 virus-like particles in women in the general population and in prostitutes. *J Clin Microbiol*, 39: 4344-4348.
- TROTTIER H, FRANCO EL. 2006. Human papillomavirus and cervical cancer: burden of illness and basis for prevention. *Am J Manag Care*, 12(17 Suppl): S462-72.
- TUREK LP, SMITH EM. 1996. The genetic program of genital human papillomaviruses in infection and cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 23(4): 735-758.
- VARSANI A, WILLIAMSON A-L, JAFFER MA, RYBICKI EP. 2006. A deletion and point mutation study of the human papillomavirus type 16 major capsid gene. *Virus Research*, 122(1-2): 154-63.
- VELAZQUEZ TA, GARIGLIO VP. 2002. Possible role of transcription factor AP1 in the tissue-specific regulation of human papillomavirus Rev Invest Clin, 54(3): 231-42.
- VERAS VS, CERQUEIRA DM, MARTINS CRF. 2005. L1 sequence of a new human papillomavirus type-58 variant associated with cervical intraepithelial neoplasia. *Braz. J Med Biol Res*, 38(1): 1-4.
- VERESS G, SZARKA K, DONG X-P, GERGELY L, PFISTER H. 1999. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol*, 80: 1035-1043.
- VILLA LL, COSTA RL, PETTA CA, ANDRADE RP, AULT KA, GIULIANO AR, WHEELER CM, KOUTSKY LA, MALM C, LEHTINEN M, SKJELDESTAD FE, OLSSON SE, STEINWALL M, BROWN DR, KURMAN RJ, RONNETT BM, STOLER MH, FERENCZY A, HARPER DM, TAMMS GM, YU J, LUPINACCI L, RAILKAR R, TADDEO FJ, JANSEN KU, ESSER MT, SINGS HL, SAAH AJ, BARR E. 2005. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol*, 6(5): 271-8.
- VILLA LL, SICHERO L, RAHAL P, CABALLERO O, FERENCZY A, ROHAN T, FRANCO EL. 2000. Molecular variants of human papillomavirus type 16

- and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol*, 81: 2959-2968.
- de VILLIERS EM, FAUQUET C, BROKER TR, BERNARD HU, ZUR HAUNSEN H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1): 17-27.
- VOLKOW P, RUBI S, LIZANO M, CARRILLO A, VILAR-COMPTE D, GARCÍA-CARRANCÁ A, SOTELO R, GARCÍA B, SIERRA-MADERO J, MOHAR A. 2001. High Prevalence of Oncogenic Human Papillomavirus in the Genital Tract of Women with Human Immunodeficiency Virus. *Gynecologic Oncology*, 82: 27-31.
- WEINBERG RA. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81(3): 323-30.
- WINKELSTEIN W JR. 1977. Smoking and cancer of the uterine cervix: hypothesis. *Am J Epidemiol*, 106(4): 257-9.
- WU Y, CHEN Y, LI L, YU G, HE Y, ZHANG Y. 2006. Analysis of mutations in the E6/E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolates from China. *J Gen Virol*, 87(Pt 5): 1181-8.
- XI LF, KOUTSKY LA, HILDESHEIM A, GALLOWAY DA, WHEELER CM, WINER RL, HO J, KIVIAT NB. 2007. Risk for High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia Associated with Variants of Human Papillomavirus Types 16 and 18. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16(1): 4-9.
- XI LF, KOUTSKY LA, GALLOWAY DA, KYSPERS J, HUGHES JP, WHEELER CM. 1997. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*, 89(11): 796-802.
- YAMADA T, MANUS MM, PETO J, GREER CE, MUNOZ N, BOSCH FX, WHEELER CM. 1997. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol*, 71: 2463-2472.
- YAO YL, YANG WM, SETO E. 2001. Regulation of transcription factor YY1 by acetylation and deacetylation. *Mol Cell Biol*, 21(17): 5979-91.
- ZORRILLA CD. 2007. HIV infection in women: perinatal issues and cervical cancer surveillance. *Topics in HIV Medicine*, 15(1): 1-5.
- ZUR HAUSEN H. 1991. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virol*, 184(1): 9-13.

➤ Referências obtidas da Internet

<http://www.pro-celula.com.br/bethesda> - NCI BETHESDA SYSTEM 2001 WORKSHOP – Diane Solomon – Division of Cancer Prevention – National Cancer Institute –National Institutes of Health.

[http://www.iqb.com.br/Mulher\\_hiv](http://www.iqb.com.br/Mulher_hiv).

<http://www.unaids.org>. Overview of the global AIDS epidemic. 2006 Report on the global AIDS epidemic.

---

**ANEXOS**

Produtividade referente à diversidade genética do HPV:

A) Artigos científicos relacionados diretamente à tese:

**CERQUEIRA DM, MORAES DS, CAMARA GN, AMARAL FA, OYAMA CN,** dos SANTOS MQ, MARTINS CRF. 2007. High HPV genetic diversity in women infected with HIV-1 in Brazil. *Arch Virol*, 152(1): 75-83.

**CERQUEIRA DM, MORAES DS, MILANEZI N, CAMARA GNL, AMARAL FA, OYAMA CNR, DOS SANTOS MQ, MARTINS CRF.** Caracterização molecular de papilomavírus humanos em mulheres co-infectadas com o vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 no Distrito Federal e Entorno. *Comunicação em Ciências da Saúde*. Submetido para publicação.

B) Artigos científicos referentes ao HPV e desenvolvidos em colaboração com o Grupo de Virologia da UnB:

ALENCAR TR, **CERQUEIRA DM**, CRUZ MR, WYANT PS, RAMALHO ED, MARTINS CR. 2007. New HPV-16 European and non-European variants in Central Brazil. *Virus Genes*, 35(1): 1-4.

VERAS VS, **CERQUEIRA DM**, MARTINS CRF. 2005. L1 sequence of a new human papillomavirus type-58 variant associated with cervical intraepithelial neoplasia. *Braz J Med Biol Res*, 38(1): 1-4.

**CERQUEIRA DM, CÂMARA GNNL, CRUZ MR, VERAS VS, ALENCAR TR,** MARTINS CRF. 2004. Human Papillomavirus Variability in the Federal District - Central Brazil. *Virus Reviews and Research*, 9: 26-31.

CRUZ MR, **CERQUEIRA DM**, CRUZ WB, CAMARA GN, BRIGIDO MM, SILVA EO, CARVALHO LG, MARTINS CR. 2004. Prevalence of human papillomavirus type 16 variants in the Federal District, Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99(3): 281-2.

CAMARA GNNL, **CERQUEIRA DM**, OLIVEIRA APG, SILVA EO, BONFIM PR, CARVALHO LGS, MARTINS CRF. 2003. Prevalence of Human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical

lesions in Central Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 98(7): 879-883.

**CERQUEIRA DM**, CAMARA GNN, CRUZ MR, SILVA EO, BRÍGIDO MM, CARVALHO LGS, MARTINS CRF. 2003. Variants of Human Papillomavirus Types 53, 58 and 66 Identified in Central Brazil. Virus Genes, 26(1): 83-87.

CAMARA GNNL, **CERQUEIRA DM**, NEVES D, SILVA EO, CARVALHO LGS, MARTINS CRF. 2001. Caracterização Molecular dos Papilomavírus Humanos em Mulheres com Lesão do Colo Uterino, em Brasília, DF. Revista de Saúde do Distrito Federal, 12(3): 39-46.

### C) Palestra

Painel HPV – Biologia Molecular. XIX Congresso Brasileiro de Citopatologia, 05 a 09 de setembro de 2006, Brasília-DF.

### D) Trabalhos apresentados em Congressos:

**CERQUEIRA DM**, CAMARA GNL, AMARAL FA, OYAMA CN, dos SANTOS MQ, MARTINS CRF. High HPV genetic diversity in women infected with HIV-1 in Brazil. 2006. 23rd International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop. Prague, Czech Republic.

**CERQUEIRA DM**, CAMARA GN, MORAES DS, AMARAL FA, OYAMA CN, dos SANTOS MQ, VERAS VS, MARTINS CRF. 2006. Human Papillomavirus Variability in the Federal District – Central Brazil. XLII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

ALENCAR TR, WYANT PS, **CERQUEIRA DM**, MORAES DS, MILANEZ NG, MARTINS CRF. 2006. Molecular Characterization of LCR and E6 of the High Risk HPVs -31, -33, -35, -52 and -58 in Brasília – Central Brazil. XVII Encontro Nacional de Virologia.

WYANT PS, ALENCAR TR, **CERQUEIRA DM**, MORAES DS, BRIGIDO MM, MARTINS CRF. 2006. Analysis of the genetic variability of the LCR, E6 and L1 of the high-risk HPVs-53, -56 and -66 in the Federal District -

- Central Brazil. In: XVII Encontro Nacional de Virologia, 2006, Campos do Jordão. Virus Reviews & Research, 2006. v. 11. p. 174-174.
- ALENCAR TR, WYANT OS, RAMALHO ED, **CERQUEIRA DM**, MARTINS C RF. 2005. Molecular Characterization of the Regulatory Region (LCR) of HPV-58 Isolates. XVI Encontro Nacional de Virologia e III Simpósio Internacional de Oncovirologia.
- CERQUEIRA DM**, MORAES DS, CAMARA GNL, AMARAL FMA, OYAMA CNR, SANTOS RMDB, VERAS NMC, MARTINS CRF. 2005. Human Papillomavirus Detection and Typing in Cervical Samples From Women Infected With Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Central Brazil. XVI Encontro Nacional de Virologia. Virus Reviews & Research, 2005. v. 10. p. 179-179.
- ALENCAR TR, WYANT OS, RAMALHO ED, **CERQUEIRA DM**, MARTINS CRF. 2005. Molecular Characterization of the Regulatory Region (LCR) of HPV-58 Isolates. XVI Encontro Nacional de Virologia. Virus Reviews & Research, 2005. v. 10. p. 179-179.
- WYANT OS, ALENCAR TR, RAMALHO ED, **CERQUEIRA DM**, CRUZ MR, OLIVEIRA JM, MARTINS CRF. 2005. New HPV-16 European and Non-European Variants in Central Brazil. Encontro Nacional de Virologia. Virus Reviews & Research, 2005. v. 10. p. 180-180.
- MARTINS CRF, **CERQUEIRA DM**, CAMARA GNL, AMARAL FMA, OYAMA CNR, SANTOS MQC. 2005. New Human Papillomaviruses in HIV Infected Women. XVI Encontro Nacional de Virologia. Virus Reviews & Research, 2005. v. 10. p. 180-180.
- VERAS VS, **CERQUEIRA DM**, CAMARA GNL, CARVALHO LGS, MARTINS CRF. 2004. L1 sequence of a new variant of HPV-58 associated with cervical intraepithelial neoplasia in Central Brazil. XXI International Papillomavirus Conference, Cidade do México. 21st Papillomavirus Conference, 2004. p. 345.



## High HPV genetic diversity in women infected with HIV-1 in Brazil

D. M. Cerqueira<sup>1,\*</sup>, D. de S. Moraes<sup>1</sup>, G. N. L. Camara<sup>2</sup>, F. A. Amaral<sup>3</sup>,  
C. N. R. Oyama<sup>4</sup>, M. Q. C. dos Santos<sup>3</sup>, and C. R. F. Martins<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pós-Graduação em Biologia Molecular, Instituto de Biologia,  
Universidade de Brasília, Brasília, Brasil

<sup>2</sup>ANVISA, Ministério da Saúde, Brasília, Brasil

<sup>3</sup>Unidade Mista de Saúde da Asa Sul, Brasília, Brasil

<sup>4</sup>Hospital Universitário, Brasília, Brasil

Received March 16, 2006; accepted June 29, 2006  
Published online August 4, 2006 © Springer-Verlag 2006

**Summary.** The present study on genetic diversity of human papillomaviruses in women infected by HIV in Brazil describes the frequency, the genotypes, and five new variants of HPV. One hundred fifty cervical smears of HIV-positive women were subjected to cytological examination, and the DNA samples obtained were assayed by MY09/MY11 amplification, followed by RFLP typing. The overall HPV-DNA-positive rate was 42.7%. One hundred twenty-two samples (81.3%) had benign cellular alterations or normal cytological results, and HPV DNA frequency among them was 30.3%. Otherwise, 96.4% of samples with altered cytology were positive for HPV DNA. A high diversity of genotypes was observed. HPVs-16 and 81 were the most prevalent (14.1%) and were followed by HPVs 52, 35, 62, 33, 53, 56, 66, 70, 18, 58, 6b, 11, 31, 39, 40, 61, 71, 32, 54, 59, 67, 68, 85, and 102. Five new variants of the high-risk HPVs 18, 33, 53, 59, and 66 were detected. Possible associations between the detection of HPV genotypes and the cytological classification, HIV viral load, CD4 count, and antiretroviral treatment were also examined. We observed that a high proportion of HIV-infected women are infected with HPV and may carry oncogenic genotypes, even when cytological evaluation shows normal results.

Financial support: Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF); Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos (FINATEC); Programa Nacional de DST e AIDS, Ministério da Saúde.

\*Fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## Introduction

Human papillomavirus (HPV) genotypes differ in their ability to produce persistent infection and progress to neoplastic disease. These differences justify the effort that has been made to characterize this virus's genetic diversity in each geographical region, as well as to identify new isolates of specific HPV types [12, 19, 22].

HPV DNA and HPV-associated diseases are much more likely in individuals infected with human immunodeficiency virus (HIV), underlying that HIV-positive women should be actively screened. This is important particularly in countries such as Brazil, where, despite the fact that the HIV prevention and control programs are succeeding well, women are still increasingly infected with HIV and are also developing resistance to anti-retroviral treatment [5, 11, 17, 18].

The objective of this study was to determine the prevalence of HPV infection in women infected with HIV in Central Brazil and to describe HPV genetic diversity in this specific population. We also correlated these data with markers of HIV disease, specifically CD4+ counts, HIV viral load, and antiretroviral treatment.

## Materials and methods

From June 2004 to November 2005, 150 HIV-infected women making routine gynecological visits were invited to participate and be included in the study if they had confirmed HIV infection and had given informed consent. The local Ethics Committee on Research with Human Beings previously approved this research project. Cervical scrapes were collected for cytological analysis and HPV DNA amplification, according to a previously described protocol [16].

Cervical smears were classified into two groups: those with normal cytological results or benign cellular alterations (Group 1; G1) and those with altered cytology (Group 2; G2), including cytological alteration suggesting HPV infection (HPV), atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS) and grades 1–3 cervical intraepithelial neoplasia (CIN 1–3). HIV RNA plasma viral loads and CD4+ cell counts were obtained from patients' records maintained by the health service.

The primers pCO3 and pCO4, specific for the amplification of a fragment of the  $\beta$ -globin gene, were used as a control of the DNA extraction [4]. For the detection of HPV DNA, we used the consensus primers MY09 and MY11. HPV-DNA-positive specimens were typed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) [4, 6]. The amplified MY09/MY11 HPV segments from isolates that showed atypical RFLP profiles were cloned, and M13 forward and reverse primers were used in automated sequencing. Forward and reverse sequences were aligned with CLUSTAL W [23] and similarity analyses were performed by BLAST [2]. For each pair of primers at least two independent PCR products and sequences from both orientations were generated, to exclude PCR artifacts. The reference sequences used in comparison to Bsb isolates were obtained from the GenBank: AY262282 (HPV-18), M12732 (HPV-33), X74482 (HPV-53), X77858 (HPV-59), and U31794 (HPV-66).

A data bank was generated and analyzed in EPI-Info, 6.04d, from the Centers of Disease Control and Prevention (CDC). The level of significance of tests ( $p$ ) was set at 0.05.

## Results

One hundred fifty HIV-infected women were investigated. The mean age was 35.3 years (range, 17–61; median 34), with CD4+ counts ranging from 2 to

**Table 1.** Distribution of cytological diagnosis and HPV DNA positiveness, grouped by severity of lesions

Group	Cytological diagnosis	n	%	HPV DNA positiveness n (%)	
G1 <sup>a</sup>	Normal	41	27.3	9 (21.9)	
	Benign cellular alterations	81	54	28 (34.6)	
	Total (G1)	122	81.3	37 (30.3)	
G2 <sup>b</sup>	ASCUS	3	2	2 (66.7)	
	LSIL <sup>c</sup>	HPV	8	5.3	13 (100)
		CIN 1	5	3.3	
	HSIL <sup>d</sup>	CIN 2	6	4	12 (100)
		CIN 3	6	4	
	Total (G2)		28	18.7	27 (96.4)
Total (G1 + G2)		150	100	64 (42.7)	

<sup>a</sup>G1 Benign cellular alterations + normal results

<sup>b</sup>G2 Cytological alteration suggesting HPV infection (HPV) + atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS) + grades 1–3 cervical intraepithelial neoplasia (CIN 1–3)

<sup>c</sup>LSIL Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion

<sup>d</sup>HSIL High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion

1307 cells/ $\mu$ L (mean 426 cells/ $\mu$ L; median 398) and HIV viral loads ranging from undetectable (<50 copies/mL) to higher than 500,000 copies/mL (mean 19955.3 copies/mL; median 843).

Cytological analysis revealed a high frequency of benign cellular alterations or normal results (G1: 81.3%). The overall prevalence of altered cytological smears (G2) was 18.7%, and their distribution according to the degree of lesion is depicted in Table 1. No cases of invasive carcinoma were detected. In G2, 66.7% of samples with ASCUS were positive for HPV DNA, and all women with LSIL (low-grade squamous intraepithelial lesion – HPV or CIN 1) or HSIL (high-grade squamous intraepithelial lesion – CIN 2 or 3) were infected by HPV (Table 1).

All PCR products for the  $\beta$ -globin gene were positive. HPV DNA was identified in 64 (42.7%) HIV+ women. Of these samples, the majority were positive for oncogenic types (70.3%). HPV DNA frequency was 30.3% in G1 and 96.4% in G2, demonstrating a significantly higher prevalence of HPV infection when the cytological status was abnormal ( $p < 0.001$ ). A significant association of high-risk HPV<sub>s</sub> to G2 was also detected ( $p < 0.001$ ) (Table 2).

The presence of HPV infection was analyzed according to age. In those women aged 30 years or more (72.7%), 34.9% were positive for HPV DNA. Otherwise, among women under the age of 30 (27.3%), the majority (63.4%) were positive for HPV DNA, showing a significantly higher incidence of HPV infection in younger women ( $p < 0.002$ ).

**Table 2.** Type-specific human papillomavirus (HPV) prevalence among 150 HIV-positive women, as determined by the RFLP method

HPV types low-risk	G1 <sup>b</sup>		G2 <sup>c</sup>		Total		HPV types high-risk	G1 <sup>b</sup>		G2 <sup>c</sup>		Total	
	n	%	n	%	n	%		n	%	n	%	n	%
6b	1	2.7	1	3.7	2	3.1	16 <sup>a</sup>	5	13.5	4	14.8	9	14.1
11 <sup>a</sup>	0	0	2	7.4	2	3.1	18 <sup>a</sup>	2	5.4	1	3.7	3	4.7
32 <sup>a</sup>	1	2.7	0	0	1	1.6	31	1	2.7	1	3.7	2	3.1
40 <sup>a</sup>	1	2.7	1	3.7	2	3.1	33 <sup>a</sup>	1	2.7	3	11.1	4	6.2
61 <sup>a</sup>	1	2.7	1	3.7	2	3.1	35 <sup>a</sup>	2	5.4	3	11.1	5	7.8
62 <sup>a</sup>	5	13.5	0	0	5	7.8	39 <sup>a</sup>	0	0	2	7.4	2	3.1
71 <sup>a</sup>	1	2.7	1	3.7	2	3.1	52 <sup>a</sup>	4	10.8	2	7.4	6	9.3
81 <sup>a</sup>	8	21.6	1	3.7	9	14.1	53 <sup>a</sup>	2	5.4	2	7.4	4	6.2
102	1	2.7	0	0	1	1.6	54	1	2.7	0	0	1	1.6
Total	19	51.3	7	25.9	26	40.6	56	3	8.1	1	3.7	4	6.2
low-risk							58 <sup>a</sup>	1	2.7	2	7.4	3	4.7
							59	0	0	1	3.7	1	1.6
							66 <sup>a</sup>	3	8.1	1	3.7	4	6.2
							67	1	2.7	0	0	1	1.6
							68 <sup>a</sup>	1	2.7	0	0	1	1.6
							70 <sup>a</sup>	1	2.7	3	11.1	4	6.2
							85 <sup>a</sup>	1	2.7	0	0	1	1.6
							Total	29	78.4	26	96.3	55	85.9
							high-risk						

<sup>a</sup>Genotypes identified in co-infected samples. Classification follows the scheme of de Villiers et al. [8]

<sup>b</sup>G1 Benign cellular alterations + normal results

<sup>c</sup>G2 Cytological alteration suggesting HPV infection (HPV) + atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS) + grades 1–3 cervical intraepithelial neoplasia (CIN 1–3)

Regarding the immune status, among 19 patients with CD4+ <200, 57.9% were HPV+, and 42.1% had an abnormal cytologic result. Of 82 patients with CD4+ counts between 200 and 500, 43.9% were positive for HPV and 18.3% were from G2. Finally, 34.7% of 49 patients with a CD4+ count >500 were positive for HPV and 10.2% had abnormal cytologic findings. Statistical analysis suggested that the level of immunosuppression was associated with the prevalence of cytologic abnormalities ( $p = 0.01$ ), but not with HPV infection. Otherwise, HIV viral load was associated with detection of HPV DNA and of cytologic abnormalities ( $p < 0.005$ ). Among individuals with a viral load higher than 30,000 copies/mL, HPV DNA was detected in 73.7% and abnormal cytologic smears in 42.1%. Of the 132 patients harboring fewer than 30,000 copies/mL, 38.2% were positive for HPV DNA and 15.1% had abnormal cytologic findings.

Antiretroviral treatment was received by 66.7% of the patients on entering the study, but we did not observe a significant association between the use of this therapy and the presence of HPV or the detection of cytologic abnormalities.

		6	6	6	6	6	6	6	6	7			
		5	5	5	5	5	6	9	9	0			
		5	6	6	6	9	5	5	9	0			
		3	0	1	2	3	3	0	7	0			
	HPV-59	T	T	T	A	T	T	C	T	G	Ref.		
	ISIBRI49	T	T	T	A	C	G	A	T	T	Brazil		
	Bsb-28	A	C	A	T	T	G	A	C	T	Brazil		
		<hr/>											
		L	-	-	-	-	S	P	-	L			
		↓					↓	↓		↓			
<b>a</b>		<b>H</b>					<b>A</b>	<b>T</b>		<b>F</b>			
		319					350	449		465			
		6								6			
		9								5			
		9								4			
		8								4			
	HPV-18	A	Ref.							HPV-33	A	Ref.	
<b>b</b>	Bsb-48	G	Brazil							Bsb-98	G	Brazil	
		<hr/>											
		-								-			
		6	6	6	6	6	6	6	7	7	7		
		5	6	7	8	8	8	9	9	0	0	0	
		9	6	1	4	5	5	2	8	1	3	3	
		7	0	1	9	5	8	7	4	7	5	6	
	HPV-66	C	C	C	T	C	A	G	A	G	T	A	Ref.
	Bsb-107	T	T	A	C	A	G	A	G	A	A	C	Brazil
<b>d</b>		<hr/>											
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		6	6	6	6	6	6	6	7	7	7		
		5	6	6	7	7	9	9	0	0	0		
		9	7	8	0	4	0	9	3	4	4		
		6	7	3	4	0	8	8	4	0	1		
	HPV-53	C	T	C	T	A	G	G	T	C	A	Ref.	
	Bsb-153	A	A	T	C	G	A	A	C	A	C	Brazil	
<b>e</b>		<hr/>											
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

**Fig. 1.** Nucleotide and amino acid sequences alignment showing the variations in isolates Bsb-28, Bsb-48, Bsb-98, Bsb-107, and Bsb-153. Nucleotide positions of polymorphic sites are given across the top of the figure. Numbering refers to the first nucleotides of the HPV's reference genomes (accession numbers: HPV-18 – AY262282; HPV-33 – M12732; HPV-53 – X74482; HPV-59 – X77858; and HPV-66 – U31794), which are indicated as ref. Each row indicates, from left to right, the specimen identification, the nucleotide sequence alignment compared to the reference, and the origin of each specimen. The amino acid changes and their positions are indicated below the line, in comparison to the original amino acid. Non-conservative amino acid substitutions are in bold type

However, a significant association between the use of antiretroviral therapy and HIV viral load was verified ( $p = 0.015$ ).

Of the 26 HPV genotypes detected, 16 (61.5%) were classified as high-risk. HPVs 16 and 81 were the most prevalent (14.1%), followed by HPV-52 (9.3%). RFLP analysis indicated that 31.2% of the HPV-DNA-positive patients were infected by multiple genotypes. The distribution of HPV genotypes according to the degree of risk for cervical cancer is depicted in Table 2.

Five samples, named isolates Bsb-28, -48, -98, -107, and -153, showed atypical RFLP profiles and were further characterized by sequencing. Nucleic acid similarity between Bsb-28 and the HPV-59 reference was 98% and amino acid similarity was 97%. Eight nucleotide and four amino acid substitutions were identified. Three of the amino acid changes were non-conservative, as indicated in Fig. 1a. Isolate Bsb-48 had one synonymous nucleotide change, indicating 99% similarity to the HPV-18 reference sequence (Fig. 1b). In isolate Bsb-98, only one synonymous nucleotide change was observed, indicating 99% of similarity to HPV-33 reference sequence (Fig. 1c). Eleven synonymous nucleotide changes were detected in isolate Bsb-107, generating a similarity of 97.6% with the HPV-66 reference sequence (Fig. 1d). The Bsb-153 sequence had ten nucleotide changes that were not associated with amino acid substitutions and was 97.8% similar to that from HPV-53 reference (Fig. 1e).

## Discussion

Nucleotide substitutions in viral genomes may affect virus assembly, carcinogenic potential, and host immunologic responses. Moreover, it is still not known whether immunity to one HPV variant can protect against infection from another variant. Thus, identification of HPV genetic diversity in specific clinical settings may prove important for the rational design of diagnostic, therapeutic, and vaccine strategies [7, 21]. Besides reporting the prevalence of different HPV genotypes in HIV-infected women in central Brazil, this study describes five new HPV variants from the high-risk HPV types 18, 33, 53, 59, and 66. The low level of amino acid substitutions in these new variants probably indicates that mutations modifying the L1 protein may compromise the fitness of the virus. The variants described here included the ones that were not genotyped by RFLP and represent only a small subset of the many that may be present, suggesting that the variability and the frequency of HPV variants in Brazil may be wider and not yet fully understood, deserving further investigation.

Human papillomaviruses were frequent (42.7%) in this population of HIV-infected women from central Brazil, mainly when considering that most women had normal cytological results or benign alterations (81.3%). These results and other studies suggest that a close surveillance for cervical malignancies is warranted in HIV-infected women [7]. Diverse studies have consistently reported the prevalence of HPV infection ranging between 50 and 70% in HIV-infected women [7]. Chaturvedi et al. demonstrated a prevalence of HPV infection in HIV positive women of 48.7% [7]. Ellerbrock et al. observed a prevalence of HPV

DNA of 54% in a cohort of 264 HIV-infected U.S. women [9]. Differences in the prevalence of HPV infection potentially reflect differences in the population under investigation and in the detection method utilized. In the HIV-negative population, HPV prevalence has been reported as varying from 15 to 50% [7]. In central Brazil, HPV DNA was detected in 62% of HIV-negative women presenting abnormal cytological results [6].

The distribution of HPV types in HIV-infected women may be different from that observed in HIV-negative women from the same population and also from HIV-infected women from different geographic regions [7, 13]. Another interesting feature of HPV infection in immunocompromised patients is the detection of a large number of unusual and novel HPV types [18]. In a previous study of HIV-negative women in central Brazil, 13 different HPV genotypes – 16, 58, 31, 53, 18, 33, 35, 52, 66, 81, 6, 11, and 71 – were found [6]. In the present study of HIV-infected women, we could observe a higher diversity of HPV genotypes, as 26 different HPVs were detected.

The frequency of cervical abnormalities was 18.7% in central Brazil, which is in agreement with frequencies observed in previous studies from HIV-positive women. In a study from the Women's Interagency HIV Study (WIHS), cervical cytological findings were abnormal in 38% of HIV-positive women [15]. In Baltimore, 13% of HIV-positive women had abnormal cytological results [1]. Levi et al. observed, in two different studies, that 13.4 and 19% of Brazilian HIV-positive women presented abnormal smears on cytology [13, 14]. In central Brazil, the results from 142158 Pap-smear cytological preparations during a six-year period revealed a predominance of pre-cancerous and cancerous lesions <1% [20]. In Sweden, of the estimated one million Papanicolaou smears performed annually, about 4% show any degree of abnormality [3]. We observed that most women (96.4%) with abnormal cytology were positive for HPV DNA and that 30.3% of women with normal cytological results were also HPV positive. In a recent survey of the distribution of HPV types across the spectrum of cervical cytological categories, HPV was detected in 27% of samples from women with no intraepithelial lesions [10]. These HPV-positive women should be monitored regarding the higher likelihood of yielding cervical lesions [22].

It is not clear if HIV disease markers such as CD4+ count and viral load constitute risk factors for HPV infection [7, 13]. Most studies have provided evidence that the prevalence of HPV infection and of the occurrence of high-grade cervical HPV-associated lesions are not modified by the use of any antiretroviral therapy. The impact of this treatment and of the development of resistance on cervical dysplasia are also not well defined, and so the widespread use of HAART that has been adopted in Brazil could not lead to a reduced prevalence of genital HPV infection. The significant association between antiretroviral therapy and HIV viral load demonstrates the importance of the Brazilian HIV program, which is a model for many other countries [17]. Although this therapy may increase immunity to HPV, other factors not likely to be influenced by antiretroviral treatment may also play a role in progression to cervical cancer [18, 22]. Our results highlight the importance of monitoring HPV infection in HIV-positive women.

### Acknowledgements

To Kevin P. Karol, for reviewing this manuscript.

### References

1. Ahdieh L, Munoz A, Vlahov D, Trimble CL, Timpson LA, Shah K (2000) Cervical neoplasia and repeated positivity of human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-seropositive and -seronegative women. *Am J Epidemiol* 151(12): 1148–1157
2. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215(13): 403–410
3. Andersson S, Dillner L, Elfgrén K, Mints M, Persson M, Rylander E (2005) A comparison of the human papillomavirus test and Papanicolaou smear as a second screening method for women with minor cytological abnormalities. *Acta Obstet Gynecol Scand* 84(10): 996–1000
4. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, Peyton DL, Bauer HM, Wheller CM (1994) Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 170: 1077–1085
5. Brasil, Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer (2005) Available at: <http://www.inca.gov.br/cancer/epidemiologia/estimativa2005/brasil.html>
6. Camara GNL, Cerqueira DM, Oliveira APG, Silva EO, Carvalho LGS, Martins CRF (2003) Prevalence of human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions in the Federal District of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98(7): 879–883
7. Chaturvedi AK, Dumestre J, Gaffga AM, Mire KM, Clark RA, Braly PS, Dunlap K, Beckel TE, Hammons AF, Kissinger PJ, Hagensee ME (2005) Prevalence of human papillomavirus genotypes in women from three clinical settings. *J Med Virol* 75: 105–113
8. de Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* 324: 17–27
9. Ellerbrock TV, Chiasson MA, Bush TJ, Sun XW, Sawo D, Brudney K, Wright TC (2000) Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women. *JAMA* 283: 1031–1037
10. Evans MF, Adamson CS, Papillo JL, St John TL, Leiman G, Cooper K (2006) Distribution of human papillomavirus types in ThinPrep Papanicolaou tests classified according to the Bethesda 2001 terminology and correlations with patient age and biopsy outcomes. *Cancer* (published online: 16 Jan)
11. Ferenczy A, Coutlée F, Franco E, Hankins C (2003) Human papillomavirus and HIV coinfection and the risk of neoplasias of the lower genital tract: a review of recent developments. *CMAJ* 169(5): 431–434
12. Hagensee ME, Cameron JE, Leigh JE, Clark RA (2004) Human papillomavirus infection and disease in HIV-infected individuals. *Am J Med Sci* 328(1): 57–63
13. Levi JE, Kleter B, Quint WGV, Fink MCS, Canto CLM, Matsubara R, Linhares I, Segurado A, Vanderborght B, Neto JE, van Doorn L-J (2002) High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. *J Clin Microbiol* 40(9): 3341–3345
14. Levi JE, Fink MCS, Canto CLM, Carretiero N, Matsubara R, Linhares I, das Dores GB, Castelo A, Segurado A, Uip DE, Neto JE (2002) Human papillomavirus prevalence, viral



- load and cervical intraepithelial neoplasia in HIV-infected women. *Braz J Infect Dis* 6(3): 129–134
15. Massad LS, Riester KA, Anastos KM, Fruchter RG, Palefsky JM, Burk RD, Burns D, Greenblatt RM, Muderspach LI, Miotti P (1999) Prevalence and predictors of squamous cell abnormalities in Papanicolaou smears from women infected with HIV-1. Women's Interagency HIV Study Group. *J Acquir Immune Defic Syndr* 21(1): 33–41
  16. Nindl I, Rindfleisch K, Lotz B, Schneider A, Dürst M (1999) Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer. *Int J Cancer* 82: 203–207
  17. Okie S (2006) Fighting HIV – Lessons from Brazil. *N Engl Med* 354(19): 1977–1981
  18. Palefsky JM, Holly EA (2003) Chapter 6: Immunosuppression and co-infection with HIV. *J Natl Cancer Inst Monogr* 31: 41–46
  19. Perez-Gallego L, Moreno-Bueno G, Sarrio D, Suarez A, Gamallo C, Palacios J (2001) Human papillomavirus-16 E6 variants in cervical squamous intraepithelial lesions from HIV-negative and HIV-positive women. *Am J Clin Pathol* 116(1): 143–148
  20. Simões-Barbosa A, Feijó GC, da Silva JX, Leal IIR, Barbosa TWP (2002) A six-year follow-up survey of sexually transmitted diseases in Brasilia, the capital of Brazil. *Braz J Infect Dis* 6(3): 110–117
  21. Stewart A-NM, Eriksson AM, Manos MM, Muñoz N, Bosch EX, Peto J, Wheeler CM (1996) Intratype variation in 12 human papillomavirus types: a worldwide perspective. *J Virol* 70: 3127–3136
  22. Stier E (2003) Cervical neoplasia and the HIV-infected patient. *Hematol Oncol Clin N Am* 17: 873–887
  23. Thompson J, Higgins D, Gibson T (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* 22: 4673–4680

Author's address: Dr. Cláudia R. F. Martins, Pós-Graduação em Biologia Molecular, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, ICC Sul, 70919-900 Brasília, DF, Brasil; e-mail: cmartins@unb.br

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM MULHERES  
INFECTADAS COM O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA DO TIPO 1 NO  
DISTRITO FEDERAL E ENTORNO**

**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN WOMEN  
INFECTED WITH HIV-1 IN CENTRAL BRAZIL**

Daniela Marreco Cerqueira<sup>1,2</sup>, Daniella Sousa de Moraes<sup>1</sup>, Natália Milanezi<sup>1</sup>, Geni Neumann Lima  
Camara<sup>2</sup>, Fádía Aguiar Amaral<sup>3</sup>, Ceres Nunes Resende Oyama<sup>4</sup>, Maria Quitéria dos Santos<sup>3</sup>,  
Cláudia Renata Fernandes Martins<sup>1</sup>

1 Pós-Graduação em Biologia Molecular, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília,  
DF, Brasil

2 Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa, Ministério da Saúde, Brasília, DF, Brasil

3 Unidade Mista de Saúde da Asa Sul, Coordenação Regional de Saúde da Asa Sul da Secretaria de  
Estado de Saúde do DF, Brasília, DF, Brasil

4 Hospital Universitário, Brasília, DF, Brasil

Autor para correspondência:

Daniela Marreco Cerqueira

SHIN CA 05 lote L1 Edifício Varandas do Lago Norte II apt° 306, Lago Norte, Brasília, DF.

CEP 71503-505; e-mail: [danimarreco@yahoo.com.br](mailto:danimarreco@yahoo.com.br)

Financiamento: Programa Nacional DST/AIDS – Ministério da Saúde; Fundação de Apoio à  
Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF); Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos  
(FINATEC); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

20 páginas, 02 tabelas; 03 figuras

## Resumo

**Introdução:** a infecção por HPV é a infecção transmitida sexualmente mais comum no mundo e representa uma das infecções oportunistas que mais acomete as mulheres portadoras do HIV-1. A diversidade genética do HPV foi investigada entre mulheres infectadas pelo HIV-1 no Distrito Federal e Entorno.

**Método:** duzentas amostras cervicais de mulheres soropositivas para o HIV-1 foram submetidas a exame citopatológico e à amplificação por PCR. A genotipagem do HPV foi realizada por RFLP e as análises estatísticas pelo programa Epi Info.

**Resultados:** a prevalência do HPV foi 41%. Entre as amostras sem anormalidades citopatológicas cervicais, 29,2% tinham HPV, enquanto a maioria das amostras com citologia alterada tinha HPV (89,7%). Uma grande diversidade de genótipos foi observada: os HPV -16 e -81 foram os mais prevalentes (12,2%); seguidos pelos HPV -52, -35, -53, -58, -62, -70, -33, -66, -18, -31, -56, -61, -71, -6b, -11, -39, -40, -54, -32, -59, -67, -68, -72, -85 e -102. Foi possível observar uma incidência significativamente maior de HPV em mulheres com menos de 30 anos. As análises estatísticas sugeriram que a imunossupressão estava associada com a prevalência de anormalidades citológicas, mas não com a presença de infecção por HPV. A carga viral do HIV-1, por sua vez, estava associada com a detecção de DNA do HPV e de anormalidades citológicas. Não foi observada associação significativa entre a terapia anti-retroviral e a presença de HPV ou de anormalidades citológicas.

**Conclusão:** uma proporção elevada de mulheres soropositivas para o HIV-1 está co-infectada por HPV, e, muitas vezes, por genótipos oncogênicos, mesmo em casos onde a avaliação citológica não revela resultados anormais, demonstrando a necessidade de acompanhamento dessa população.

**Palavras-chave:** HPV; HIV; Distrito Federal.

## Abstract

**Introduction:** the present study on genetic diversity of HPV in women infected by HIV in Central Brazil describes the frequency and genotypes of HPV.

**Method:** 200 cervical smears of HIV positive women were submitted to cytological examination and the DNA samples obtained were assayed by PCR amplification, followed by RFLP typing. Statistical analyses were performed by Epi Info.

**Results:** the overall HPV DNA positive rate was 41%. 161 samples (80.5%) had benign cellular alterations or normal cytological results and HPV DNA frequency among them was 29.2%. Otherwise, almost all samples (89.7%) with altered cytology were positive for HPV DNA. A high diversity of genotypes was observed. HPV -16 and -81 were the most prevalent (12.2%); followed by HPV -52, -35, -53, -58, -62, -70, -33, -66, -18, -31, -56, -61, -71, -6b, -11, -39, -40, -54, -32, -59, -67, -68, -72, -85, and -102. We observed a significantly higher incidence of HPV infection in women under the age of 30. Statistical analysis suggested that immunosuppression was associated with the prevalence of cytologic abnormalities, but not with HPV infection. Otherwise, HIV viral load was associated with detection of HPV DNA and of cytologic abnormalities. No significant association between the use of antiretroviral therapy and the presence of HPV or the detection of cytologic abnormalities was verified.

**Conclusion:** a high proportion of HIV-infected women are infected with HPV and may carry oncogenic genotypes, even when cytological evaluation shows normal results. These results underscore the importance of monitoring HIV-HPV co-infected women with regarding to the development of cervical lesions.

**Key words:** HPV; HIV; Central Brazil.

## INTRODUÇÃO

O câncer cervical é a segunda causa de morte por câncer em mulheres em todo o mundo. Em muitos países em desenvolvimento, ainda é a principal causa de morte por câncer em mulheres. Devido à associação entre alguns genótipos do papilomavírus humanos (HPV) e o câncer cervical observada em estudos epidemiológicos, a infecção por HPV foi reconhecida em 1992, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como a principal causa do câncer cervical<sup>1</sup>.

De acordo com dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer de colo do útero é o segundo mais comum entre mulheres no mundo sendo responsável, anualmente, por cerca de 470 mil casos novos e pelo óbito de, aproximadamente, 230 mil mulheres por ano. Quase 80% dos casos novos ocorrem em países em desenvolvimento onde, em algumas regiões, esse é o câncer mais comum entre as mulheres. Para 2006, as estimativas do INCA sobre incidência previam 19260 novos casos de câncer de colo do útero, com um risco estimado de 20 casos a cada 100 mil mulheres. No Distrito Federal, para 2006, estimava-se uma incidência de 22,63 novos casos de câncer de colo do útero para cada 100 mil mulheres<sup>2</sup>.

A classificação atual do HPV em genótipos baseia-se na comparação de seqüências de nucleotídeos do gene L1. Cada genótipo de HPV difere dos outros em, pelo menos, 10% na seqüência de nucleotídeos de L1. Em casos nos quais a diferença na seqüência desse gene varia entre 2 e 10%, o isolado é considerado um subtipo. Variantes de um determinado genótipo diferem em menos de 2% do isolado original, denominado “protótipo”<sup>3,4</sup>.

Os genótipos são subdivididos em cutâneos, que infectam a pele, e mucosotróficos, que infectam as mucosas urogenitais, anais e ororrespiratória. Dentre os mais de 100 genótipos de HPV descritos, cerca de 30 podem infectar o trato genital<sup>3</sup>. Esses HPV mucosotróficos podem ser ainda considerados como de baixo ou alto risco, de acordo com o potencial de progressão para neoplasias. A manifestação patológica da infecção pode ser uma tumoração benigna, verruga ou papiloma, associada aos HPV de baixo risco. Essa manifestação pode progredir para condições malignas, displasia e neoplasia intra-epitelial cervical (NIC), que estão associadas aos HPV de alto risco<sup>1,5</sup>.

Vacinas contra HPV estão em desenvolvimento e um dos principais problemas é determinar acuradamente que genótipos de HPV devem ser incluídos, pois variações geográficas na prevalência dos tipos são observadas<sup>6</sup>. Uma dessas vacinas, a quadrivalente contra os HPV -6, -11, -16 e -18, já foi registrada no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e encontra-se, atualmente, em comercialização. O registro da vacina bivalente contra os HPV -16 e -18 está em fase de análise pela Anvisa.

O HPV representa uma das infecções oportunistas que mais acomete as mulheres portadoras do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1). Em 1993, o câncer de colo uterino foi a neoplasia mais freqüente entre mulheres com AIDS. Desde então, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças nos Estados Unidos (*Center for Disease Control and Prevention* - CDC) declarou que o carcinoma cervical invasivo (CCI) enquadra-se na lista de doenças definidoras da AIDS em mulheres infectadas pelo HIV<sup>5,7</sup>.

A infecção pelo HIV-1 pode acelerar a progressão das lesões associadas ao HPV. Essas lesões associadas ao HPV comprometem a mucosa do colo uterino e podem evoluir para lesões de alto grau. Em geral, o câncer cervical invasivo demora cerca de dez anos para se desenvolver em mulheres infectadas apenas com o HPV. Entretanto, no caso das mulheres co-infectadas por HIV-1 e HPV, esse período pode ser de um ou dois anos. Além disso, a replicação do HPV pode ser mais eficiente em um hospedeiro imunodeficiente, o que resultaria em uma maior taxa de detecção e em maior probabilidade de desenvolvimento de uma infecção persistente pelo HPV. Outro fator que pode explicar a associação entre HIV-1 e HPV é a via comum de transmissão, ou seja, sexual<sup>8,9</sup>.

No Distrito Federal, não há dados sobre a prevalência e a variabilidade do HPV em amostras de mulheres co-infectadas pelo HIV-1. Com vistas a ampliar o conhecimento sobre a variabilidade do HPV nesse grupo específico de indivíduos e a compreender melhor a interação entre HPV e HIV-1 na co-infecção, os objetivos deste trabalho foram: i) determinar a prevalência da infecção por HPV em mulheres infectadas pelo HIV-1; ii) determinar a freqüência dos genótipos de HPV nessa população de mulheres soropositivas para o HIV-1; iii) determinar a prevalência e os tipos de lesões

associadas à infecção por HPV em amostras de mulheres co-infectadas com HIV-1; iv) estabelecer correlações entre os marcadores da infecção pelo HIV, especificamente a contagem de linfócitos T CD4 e a carga viral, com a presença de infecção por HPV e o tipo de lesão associada; v) determinar a relação entre o tratamento anti-retroviral, a presença de infecção por HPV e o tipo de lesão associada na população em estudo.

## **METODOLOGIA**

**População de estudo.** A população alvo do estudo foi constituída de mulheres, com sorologia reagente para HIV-1, e residentes no Distrito Federal e Entorno (incluindo as Regiões Administrativas de Brasília, Gama, Taguatinga, Brazlândia, Sobradinho, Planaltina, Paranoá, Núcleo Bandeirante, Ceilândia, Guará, Cruzeiro, Samambaia, Santa Maria, São Sebastião, Recanto das Emas, Lago Sul, Riacho Fundo, Lago Norte, Candangolândia, Águas Claras, Riacho Fundo II, Sudoeste/Octogonal, Varjão, Park Way, Setor Complementar de Indústria e Abastecimento, Sobradinho II, Jardim Botânico e Itapuã). Foram considerados os seguintes critérios de inclusão: a) assinatura do consentimento livre e esclarecido, conforme as normas de pesquisa envolvendo seres humanos; b) idade superior a 13 anos; c) disponibilidade dos dados referentes à infecção por HIV-1 (carga viral e contagem de linfócitos T CD4+); d) disponibilidade de dados referentes ao laudo citopatológico cervical; e) disponibilidade de dados relativos ao tratamento anti-retroviral.

A amostragem de indivíduos incluídos no estudo foi de 200 mulheres. Esse número de amostras foi definido como representativo da população feminina soropositivas para o HIV-1 do DF, utilizando-se o programa Statcalc Epi-6 (CDC), para um nível de confiança de 99,9%. As amostras foram coletadas no período de 07/06/2004 a 14/12/2006, sendo nove amostras provenientes do Hospital Universitário de Brasília (HUB), três amostras do Hospital Regional de Sobradinho, duas amostras provenientes de consultório particular e 186 amostras da Unidade Mista de Saúde da Asa Sul (Hospital Dia), que é centro de referência para tratamento de pacientes infectados por HIV no DF e Entorno. O estudo ora apresentado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde do Governo do Distrito Federal.

**Coleta de dados.** Foi utilizado um questionário estruturado para coleta dos seguintes dados: idade, resultado do teste de carga viral do HIV-1, resultado do teste de contagem de células T CD4+, tratamento anti-retroviral realizado no momento da coleta e laudo citopatológico cervical. Os dados assim obtidos foram utilizados para a execução dos objetivos desse projeto, sendo importante salientar que a privacidade das pacientes incluídas foi garantida, de forma que o nome de cada uma não foi vinculado às demais informações. Para tanto, todas as amostras foram previamente codificadas e, através desses códigos, identificamos os dados acima mencionados, não tendo sido feita nenhuma identificação de pacientes por nome.

**Coleta e processamento das amostras.** As coletas foram realizadas, principalmente, na Unidade Mista de Saúde do Distrito Federal (Hospital Dia, Asa Sul), que atende e acompanha o tratamento dos portadores de HIV-1. Pacientes de outros estabelecimentos constituintes do Serviço de Saúde do DF, a saber, Hospital Universitário de Brasília (HUB) e Hospital Regional de Sobradinho, também foram incluídas neste estudo. O procedimento de coleta de um raspado de células do colo do útero foi realizado pelo médico que atendeu à paciente no referido serviço de saúde.

O material coletado foi transferido para tubos estéreis, contendo 5 ml de tampão fosfato salino (PBS) (pH  $7,2 \pm 0,1$ ). Os tubos foram transportados em condições refrigeradas para a Universidade de Brasília, onde foram vortexados e centrifugados por 10 minutos a 4000 rpm, para a precipitação das células. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 ml de tampão [10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl] e aquecidas à 95°C por 15 minutos<sup>10</sup>. O material biológico assim obtido foi armazenado em *freezer* a -80 °C.

Para controle da qualidade do DNA no material biológico, foi realizada amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR), usando-se os *primers* pCO3/pCO4, que amplificam um fragmento de 110 pares de bases (pb) do gene da beta globina. As amostras negativas para amplificação da beta globina foram consideradas inadequadas e excluídas do estudo.

**Detecção e genotipagem do HPV.** As amostras foram amplificadas por PCR, usando-se *primers* específicos para um fragmento do gene L1 (MY09/MY11), além de controles negativos e positivos adequados<sup>11</sup>. As amostras amplificadas foram analisadas em gel de agarose.

Quando apresentaram produtos de PCR resultantes da amplificação por MY09/MY11 com tamanho aproximado de 450 pb, as amostras foram submetidas à análise de polimorfismo (RFLP) após a digestão com as enzimas de restrição *Bam* HI, *Dde* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Pst* I, *Rsa* I e *Sau* 3AI. Nessa metodologia, cada amostra digerida foi analisada em gel de poliacrilamida 8% e comparada com perfis de restrição característicos de cada genótipo de HPV descritos na literatura<sup>11,12</sup>.

As amostras amplificadas com MY09/MY11 que não puderam ser genotipadas por RFLP foram clonadas e seqüenciadas automaticamente, o que permitiu a caracterização do(s) genótipo(s) do(s) vírus presente(s)<sup>13</sup>. As amostras não amplificadas com MY09/MY11 foram consideradas negativas para a presença de HPV, de acordo com a metodologia utilizada.

## RESULTADOS

Foram obtidas 200 amostras de células da mucosa da cérvix uterina, provenientes de pacientes atendidas na rede de saúde do DF. A média de idade foi de 35,8 anos (variação: 17-61; mediana: 35,5), com contagem de células CD4+ variando de 2,0 a 1336 células/ $\mu$ L (média: 421,7 mediana: 393) e carga viral do HIV-1 variando de indetectável (<50 cópias/mL) a 500000 cópias/mL (média: 18210,1; mediana: 942). Entre as mulheres soropositivas para o HIV-1, 30 (15%) estavam imunocomprometidas (contagem de CD4+ <200/ $\mu$ L).

Dentre as 200 amostras analisadas, 82 (41%) apresentaram resultado positivo para HPV em PCR, enquanto 118 (59%) apresentaram resultado negativo para HPV em PCR.

A maioria das mulheres (75,5%; n = 151) tinha idade igual ou superior a 30 anos. Foi possível observar que a presença de infecção por HPV foi significativamente maior (59,2%; 29/49) entre as mulheres com menos de 30 anos, quando comparadas àquelas com 30 anos ou mais (35,1%; 53/151) (p < 0,003).



**Genotipagem.** O DNA do HPV foi identificado em 82 (41%) das 200 mulheres soropositivas para o HIV-1. Dessas amostras positivas para HPV, 72% estavam infectadas com genótipos oncogênicos (59/82). A análise por RFLP sugeriu que 26 (13%) das 82 pacientes positivas para DNA do HPV estavam infectadas por múltiplos genótipos. A distribuição desses genótipos, de acordo com o risco de desenvolvimento de câncer cervical, está apresentada na Figura 1.

Dos 27 genótipos detectados, 17 (63%) eram de alto risco e 10 (37%) de baixo risco. Os HPV -16 e -81 foram os mais prevalentes (12,2%; n = 10), seguidos pelos HPV -52 (9,8%; n = 8), -35, -53, -58, -62 e -70 (7,3%; n = 6), -33, e -66 (6,1%; n = 5), -18, -31, -56 e -61 (4,9%; n = 4), -71 (3,7%; n = 3), -6b, -11, -39, -40 e -54 (2,4%; n = 2) e -32, -59, -67, -68, -72, -85 e -102 (1,2%; n = 1) (Figura 1).

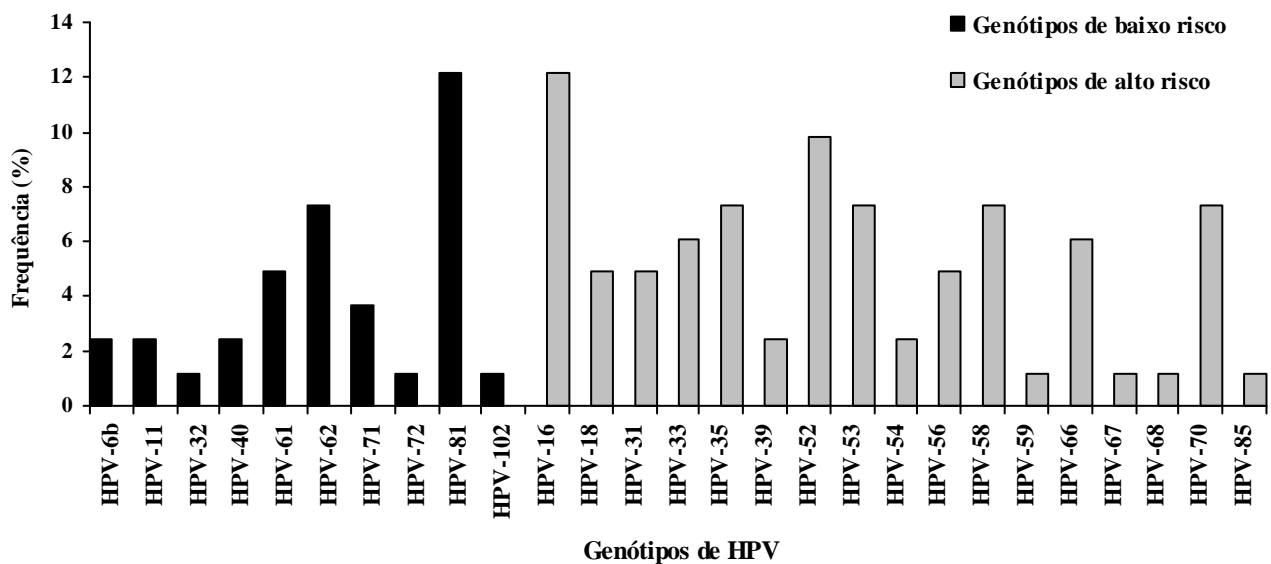


Figura 1. Frequência dos genótipos de HPV, de acordo com o risco de progressão para câncer, entre as mulheres soropositivas para o HIV-1 no Distrito Federal e Entorno.

**HPV X Citopatologia.** As 200 amostras obtidas foram classificadas em dois grupos com relação aos laudos citopatológicos:

- Grupo 1 (G1) – amostras com diagnóstico citopatológico descrito como: i) dentro dos limites da normalidade, no material examinado; ii) alterações celulares benignas,

incluindo inflamação, reparação, metaplasia escamosa imatura, atrofia com inflamação ou radiação;

- o Grupo 2 (G2) – amostras com diagnóstico citopatológico alterado, com atipias celulares incluindo: i) lesão intra-epitelial de baixo grau - LSIL (compreendendo efeito citopático pelo HPV - HPV e neoplasia intra-epitelial cervical grau I - NIC I); ii) lesão intra-epitelial de alto grau - HSIL (compreendendo neoplasias intra-epiteliais cervicais graus II e III - NIC II e III); iii) células atípicas de significado indeterminado - ASCUS.

Com relação ao laudo citopatológico, 161 amostras (80,5%) apresentaram resultados normais ou apenas alterações celulares benignas, constituindo o grupo G1. Por outro lado, 39 amostras (19,5%) pertenciam ao grupo G2: LSIL (53,8%; 21/39); HSIL (35,9%; 14/39); e ASCUS (10,2%; 4/39) (Figura 2).

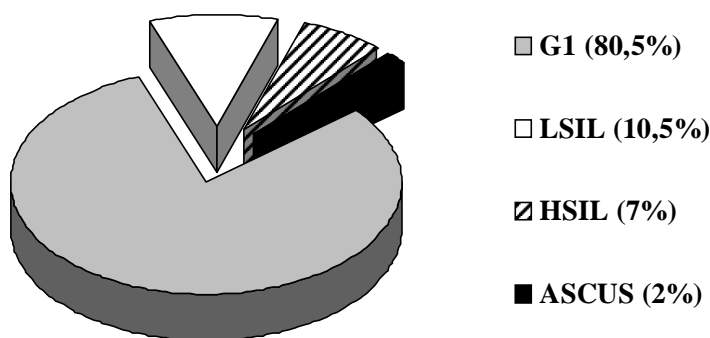


Figura 2. Distribuição dos laudos citopatológicos cervicais entre as pacientes do Distrito Federal e Entorno. G1: grupo 1, incluindo diagnóstico citopatológico normal ou alterações celulares benignas; LSIL: lesão intra-epitelial de baixo grau; HSIL: lesão intra-epitelial de alto grau; ASCUS: células atípicas de significado indeterminado.

Em G1, 114 amostras (70,8%) apresentaram resultados negativos para HPV em PCR e 47 amostras (29,2%) apresentaram resultados positivos. Por outro lado, em G2, a maior parte das amostras (89,7%; n = 35) foram positivas para HPV e apenas 4 amostras (10,3%) foram negativas,

observando-se uma prevalência significativamente maior de infecção por HPV em G2 ( $p < 0,0001$ ) (Figura 3).

A análise dos genótipos de HPV entre os dois grupos citológicos revelou que, em G1, 66% das amostras positivas para DNA de HPV estavam infectadas por HPV de alto risco e 34% por HPV de baixo risco. Em G2, a maioria das amostras HPV positivas também foi positiva para infecção por genótipos de alto risco (80%; 28/35) e apenas 7 amostras (20%) estavam infectadas por genótipos de HPV de baixo risco. Uma associação significativa entre os HPV de alto risco e G2 pôde ser observada ( $p < 0,0001$ ).

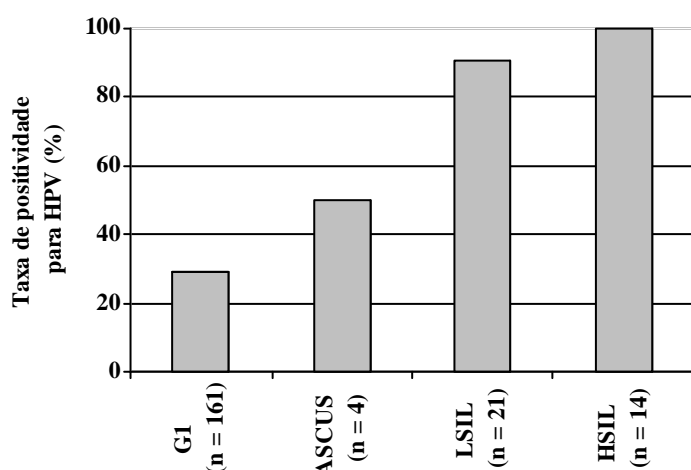


Figura 3. Relação entre os laudos citopatológicos, agrupados de acordo com a severidade das lesões, e a positividade para DNA do HPV. G1: Alterações celulares benignas ou resultados normais; ASCUS: células atípicas de significado indeterminado; LSIL: lesão intra-epitelial de baixo grau; HSIL: lesão intra-epitelial de alto grau.

**HPV x HIV-1.** A frequência de infecção por HPV e de anormalidades citopatológicas nessa população foi analisada com relação à contagem de células CD4+ das mulheres infectadas por HIV-1. Para tanto, as mulheres foram divididas em três grupos:  $<200$ , 200-500 e  $>500$  células CD4+/ $\mu\text{L}$ . Trinta pacientes (15%) tinham CD4+  $<200$ ; dentre elas, 17 (56,7%) eram positivas para o HPV e 12 (40%) apresentaram resultado alterado no exame citológico (G2). Das 110 pacientes (55%) com

contagem de CD4+ entre 200 e 500, 46 (41,8%) foram positivas para HPV e 21 (19,1%) pertenciam ao G2. Finalmente, das 60 pacientes (30%) com contagem de CD4+ >500, 19 (31,7%) foram positivas para HPV e apenas 6 (10%) apresentaram anormalidade no laudo citopatológico. As análises estatísticas sugeriram que as anormalidades citológicas estavam associadas ao nível de imunossupressão ( $p < 0,005$ ), mas não foi possível observar associação estatisticamente significativa entre a prevalência de infecção por HPV e o nível de imunossupressão.

A carga viral do HIV-1 estava associada à ocorrência de anormalidades citológicas e à detecção de DNA do HPV ( $p < 0,008$ ). Entre os 22 indivíduos com carga viral superior a 30000 cópias/mL, a prevalência de infecção por HPV foi de 68,2% e de anormalidades citológicas foi de 40,9%. Entre as 178 pacientes com carga viral menor que 30000 cópias/mL, o DNA do HPV foi detectado em 37,6% e anormalidades citológicas em 16,8% (Tabela 1).

Tabela 1. Relação entre os resultados de exame citológico cervical, a infecção por HPV e os marcadores da infecção por HIV-1 (CD4+ e carga viral).

	<b>Citopatologia</b>	
	Normal / Alterações celulares benignas n = 161	Alterada n = 39
HPV negativa	114 (70,8%)	4 (10,3%)
HPV positiva, alto risco	31 (19,2%)	28 (71,8%)
HPV positiva, baixo risco	16 (9,9%)	7 (17,9%)
HPV positiva, co-infecção	12 (7,4%)	14 (35,9%)
CD4+/ $\mu$ L média / mediana	446,9 / 415	317,8 / 280
Carga viral do HIV média / mediana	11351,4 / 780	46524,1 / 3736

A maioria (68%, n = 136) das pacientes estava sob algum tipo de tratamento anti-retroviral, com 16/136 (11,8%) em terapia quádrupla, 93/136 (68,4%) em tripla e 27/136 (19,8%) em dupla. Cinquenta e oito pacientes submetidas ao tratamento foram positivas para DNA do HPV (42,6%) e 78 (57,3%) foram negativas. Das 136 pacientes em tratamento, 29 (21,3%) apresentaram laudo

citopatológico cervical alterado (G2). As demais 64 mulheres (32%) soropositivas para o HIV-1 não estavam recebendo qualquer tratamento anti-retroviral ao entrar no estudo. Dentre elas, 37,5% (24/64) eram positivas para DNA do HPV e 62,5% (40/64) eram negativas. Dentre essas 64 pacientes que não estavam recebendo anti-retrovirais, 10 (15,6%) pertenciam ao G2. Não foi observada uma associação significativa entre o uso de drogas anti-retrovirais e a presença de HPV ou de anormalidades citológicas (Tabela 2).

Tabela 2. Relação entre a presença de infecção por HPV, os marcadores da infecção por HIV-1 (CD4+ e carga viral) e o tratamento anti-retroviral.

	HPV n (%)	HPV alto risco n (%)	HPV baixo risco n (%)
<b>CD4+/<math>\mu</math>L</b>			
< 200 (n = 30)	17 (56,7)	14 (46,7)	3 (10)
200-500 (n = 110)	46 (41,8)	33 (30)	13 (11,8)
> 500 (n = 60)	19 (31,7)	12 (20)	7 (11,7)
<b>HIV carga viral (cópias/mL)</b>			
< 30000 (n = 178)	67 (37,6)	45 (25,3)	22 (12,4)
> 30000 (n = 22)	15 (68,2)	14 (63,6)	1 (4,5)
<b>Terapia Anti-retroviral</b>			
Sim (n = 136)	58 (42,6)	40 (29,4)	18 (13,2)
Não (n = 64)	24 (37,5)	19 (29,7)	5 (7,8)

## DISCUSSÃO

**Prevalência do HPV** - As infecções por HPV são as doenças sexualmente transmitidas mais comuns atualmente. Estudos utilizando teste para DNA de HPV em mulheres assintomáticas na população geral estimam que a prevalência de infecção por HPV varie de 2-44%. Essa ampla variação nas estimativas de prevalência é bem explicada por diferenças de idade entre as amostras populacionais estudadas, por diferenças na sensibilidade molecular dos vários ensaios usados para detectar o DNA do HPV e devido ao fato de que populações diferentes são estudadas<sup>14</sup>.

Um estudo internacional multicêntrico conduzido pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) forneceu dados de 15 áreas em 4 continentes, envolvendo mulheres com idades entre 15 e 74 anos. A prevalência de HPV variou de menos de 5% em alguns países mediterrâneos e

do sudeste asiático a mais de 15% em diversos países da América Latina e entre algumas populações africanas<sup>15</sup>.

Os resultados obtidos sobre a prevalência de HPV em mulheres soropositivas para o HIV-1 do DF (41%), assim como os divulgados em outros estudos, sugerem que é necessário o monitoramento constante de patologias cervicais em mulheres infectadas por HIV-1<sup>16</sup>. Chaturvedi *et al.* observaram, nos Estados Unidos, uma prevalência de 48,7% de infecção por HPV em mulheres soropositivas para o HIV-1. Esses dados também são compatíveis com os obtidos em estudos anteriores, que relatam, freqüentemente, que a prevalência de infecção por HPV varia entre 50-70%, de acordo com a população em estudo<sup>16</sup>. Em estudo conduzido na Itália sobre a distribuição dos HPV entre mulheres imigrantes e com histórico de prostituição, observou-se que 42,2% das amostras foram positivas para HPV, com taxas de detecção de 57,1% entre as soropositivas para o HIV-1 e 35,5% entre as soronegativas para o HIV-1<sup>17</sup>. Na região sudeste do Brasil, foi demonstrado, por PCR, que 87% das mulheres soropositivas para o HIV-1 apresentavam DNA do HPV<sup>18</sup>. Essas variações na prevalência de infecção por HPV refletem, provavelmente, diferenças nas populações estudadas e nos métodos de detecção do HPV utilizados. Na população soronegativa para o HIV-1, tem sido relatado que a prevalência do HPV varia entre 15% a 50%, dependendo das características da população de estudo<sup>16</sup>. No geral, os resultados são consistentes e indicam que cerca de 50% de todas as mulheres estão infectadas por HPV, caracterizando um problema mundial de saúde pública.

O estudo dos diferentes genótipos do HPV em cada região pode contribuir para o controle e para o tratamento da doença associada ao HPV, definindo-se a relevância de pesquisas epidemiológicas moleculares. Esses estudos podem fornecer evidências sobre a existência de diferenças biológicas na transmissibilidade e patogênese entre os diversos genótipos do HPV, além de contribuir para o desenvolvimento e utilização efetiva de vacinas. A distribuição dos genótipos do HPV no Brasil parece ser complexa, já que sua prevalência pode diferir significativamente mesmo entre cidades bem próximas. Porém, é importante destacar que a distribuição dos genótipos de HPV tem determinantes próprios e que os dados de um local não podem ser generalizados para todo o país

ou mesmo para uma região geográfica. Além disso, conforme tem sido verificada na literatura, a distribuição dos diversos genótipos do HPV parece ser diferente de acordo com o cenário clínico em estudo como, por exemplo, entre populações soropositivas e soronegativas para o HIV-1.

Os genótipos mais freqüentes de HPV entre as mulheres soropositivas para o HIV-1 no DF foram os HPV -16 e -81 (12,2%). A seguir, foram mais freqüentes os HPV -52, -35, -53, -58, -62, -70, -33, -66, -18, -31, -56, -61, -71, -6b, -11, -39, -40, -54, -32, -59, -67, -68, -72, -85 e -102. Sabe-se que o HPV-16 é o genótipo mais prevalente em todo o mundo. A Agência Internacional de Pesquisa sobre o câncer (IARC) divulgou, recentemente, resultados de uma análise sobre a distribuição mundial de genótipos de HPV, onde o genótipo mais comum foi o HPV-16, seguido pelos HPV -42, -58, -31, -18, -56, -81, -35, -33 e -45. As diferenças na prevalência dos genótipos de HPV podem estar relacionadas à complexa inter-relação geográfica e biológica entre os diferentes genótipos ou variantes de HPV e fatores imunogenéticos do hospedeiro<sup>19</sup>. Os resultados aqui encontrados confirmam a necessidade de estudos epidemiológicos para verificar o risco de genótipos de HPV menos comuns, para identificar vírus desconhecidos e para monitorar a eventual dispersão de genótipos virais não usuais relacionados a programas de vacinação e/ou mobilidade populacional<sup>20</sup>.

**HPV x Idade** - A idade mediana de início da vida sexual é de cerca de 16 anos na maioria dos países. Após 5 anos do início da vida sexual, aproximadamente 50% das mulheres jovens já estão infectadas com no mínimo um dos 40 genótipos de HPV que infectam os genitais. Os resultados obtidos no DF mostram uma prevalência significativamente mais alta de HPV entre mulheres jovens (< 30 anos), o que está de acordo com o relatado na literatura que indica que a incidência máxima da infecção por HPV ocorre em adultos jovens<sup>9,21</sup>.

Os adultos jovens sexualmente ativos representam a parcela da população com maior risco de adquirir HPV, conforme estudos epidemiológicos que mostram que a prevalência de infecção por HPV é mais alta entre mulheres jovens sexualmente ativas, indicando uma redução no risco após a idade de 30 anos. A redução no risco de infecção por HPV com o aumento da idade parece ser independente de mudanças no comportamento sexual, sugerindo um papel da resposta imune.

Entretanto, um segundo pico de infecção por HPV em idades avançadas também é uma característica comum das descobertas epidemiológicas<sup>14,15</sup>.

**HPV x Laudo citopatológico** - Em estudo sobre a distribuição dos genótipos de HPV entre o espectro de categorias de citologia cervical, o DNA viral foi detectado em 27% das amostras sem lesão intra-epitelial, em 89,5% das amostras com ASCUS, em 97,5% das amostras com LSIL e em 96,5% das amostras com HSIL. Esse estudo concluiu que a detecção de HPV de alto risco por PCR pode beneficiar o manejo das pacientes com lesões de baixo grau<sup>22</sup>.

Na Suécia, de 1 milhão de testes de Papanicolau realizados por ano, cerca de 4% apresentam qualquer grau de anormalidade. Considerando-se as mulheres com atipias de baixo grau analisadas, 66% eram positivas para DNA do HPV, o que demonstra a importância da confirmação da infecção utilizando-se técnicas moleculares, mesmo em mulheres com laudos citopatológicos sugestivos de infecção por HPV<sup>23</sup>. Na Itália, entre 414 mulheres estudadas, as prevalências de infecção por HPV foram 19,7%, 63,4%, 80% e 81,5% entre pacientes com cérvix normal, lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau, de alto grau e carcinomas cervicais, respectivamente. Um total de 31 genótipos foi identificado e, como esperado, o HPV-16 foi o mais frequente<sup>20</sup>.

Em estudo recente no Rio de Janeiro, Carvalho *et al.* observaram que a prevalência geral de DNA do HPV foi de 50,1%, variando de 25% entre mulheres classificadas como normais no teste de Papanicolau para 100% entre mulheres com diagnóstico de HSIL. Diferenças estatisticamente significativas foram detectadas entre as porcentagens de indivíduos com infecção por HPV com cérvix normal versus HSIL<sup>6</sup>. No DF, observamos uma prevalência de HPV entre as mulheres soropositivas para o HIV-1 sem anormalidades no laudo citopatológico de 29,2%. Por outro lado, entre as mulheres com algum tipo de anormalidade cervical, a prevalência de DNA do HPV foi de 89,7%, semelhante ao que tem sido relatado na literatura.

A presença de DNA do HPV entre amostras cervicais normais pode caracterizar infecções latentes ou lesões cervicais incipientes, caracterizando um baixo nível de replicação gênica do HPV. Esses casos devem ser monitorados por representarem um maior risco de desenvolvimento de lesão



em tais mulheres infectadas. Mesmo um único teste positivo para HPV em mulheres citologicamente normais é substancialmente preditivo de lesão de alto grau. Entretanto, outra explicação poderia ser devido à presença de erros no teste de DNA ou no diagnóstico citológico. A positividade para DNA de HPV, mesmo quando a amostra citológica é negativa, pode determinar a necessidade de um melhor acompanhamento clínico. Além disso, fatores ambientais e imunológicos do hospedeiro podem ter um papel importante no desenvolvimento de lesões cervicais. A história natural de uma infecção genital por HPV, incluindo os tipos e a carga viral do HPV ao longo do tempo, pode influenciar o risco de lesão, bem como sua tendência de regredir, persistir ou progredir<sup>6</sup>.

Por outro lado, a presença de amostras negativas para HPV entre mulheres com laudos citopatológicos apresentando atipias celulares pode ser explicada pelo fato de que, segundo as diretrizes da Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia Cervical (ASCCP), da perspectiva de triagem de câncer de colo do útero, um resultado de exame citopatológico alterado com teste negativo para DNA de HPV representa, na maioria das vezes, um resultado falso-positivo. O exame de Papanicolau é apenas um recurso de triagem, cuja sensibilidade é de 70%, e as anormalidades detectadas por ele requerem uma avaliação definitiva por colposcopia e biópsia<sup>24</sup>.

**HPV x HIV-1** – A incidência de lesões cervicais de alto grau em mulheres soropositivas para o HIV está relacionada ao seu estado imune, expresso pela contagem de células CD4. Além disso, as mulheres soropositivas para o HIV-1 quando comparadas às soronegativas para o HIV-1 apresentam uma progressão mais rápida à lesão de alto grau após infecção por HPV<sup>7</sup>.

Em estudo sobre HIV-1 entre mulheres (*Women's Interagency HIV Study - WIHS*), a positividade do HIV-1, positividade do HPV, baixa contagem de células CD4+ e elevado número de cópias de RNA do HIV-1 estavam associados com a incidência de anormalidades citológicas. Na literatura, os relatos sobre o impacto do tratamento anti-retroviral sobre a história natural e tratamento de lesões cervicais são variados, provavelmente devido a diferenças no desenho e desenvolvimento do estudo, padrões de uso dos anti-retrovirais e populações estudadas. De forma geral, os dados sugerem que esses medicamentos têm um impacto positivo modesto sobre a história natural de

neoplasias. Foi demonstrado que mulheres que recebem a terapia anti-retroviral têm uma menor incidência de HSIL e uma maior taxa de regressão dessas lesões para lesões de baixo grau. Entretanto, ainda não foi demonstrada uma redução na incidência de câncer cervical associada ao tratamento anti-retroviral<sup>25</sup>.

Já foi relatado na literatura que o nível de RNA do HIV-1 no plasma está associado à presença de DNA do HPV em amostras cervicais e à detecção de anormalidades no exame citológico. No entanto, não é fácil selecionar marcadores que possam ser usados para identificar um subgrupo de mulheres soropositivas para o HIV-1 que tenha maior probabilidade de apresentar infecção concomitante por HPV. Diversos fatores epidemiológicos são comuns a todas as mulheres infectadas por HIV-1 e não podem ser usados para caracterizar aquelas em risco particularmente alto de infecção por HPV e de doença cervical. Também já foi demonstrado que contagens reduzidas de células CD4 em pacientes infectados por HIV-1 estão associadas à doença cervical e a taxas mais altas de infecção por HPV<sup>26</sup>.

No DF, as análises estatísticas sugeriram que as anormalidades citológicas estavam associadas ao nível de imunossupressão, mas não foi possível observar associação estatisticamente significativa entre a prevalência de infecção por HPV e a contagem de células CD4. Por outro lado, a carga viral do HIV-1 estava associada à ocorrência de anormalidades citológicas e à detecção de DNA do HPV. A análise do uso de drogas anti-retrovirais não demonstrou uma associação significativa com a presença de HPV ou de anormalidades citológicas.

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 1 - CHOW LT, BROKER TR. Small DNA tumor viruses. Chapter 12: 267-301. *In*: Nathanson N. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia; 1997.
- 2 - INCA, 2006. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/>. Acessado em 03/2007.
- 3 - BERNARD HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol*. 2005; 32:S1-6.

- 4 - BERNARD HU, CALLEJA-MACIAS IE, DUNN ST. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer*. 2005; 118(5):1071-6.
- 5 - CLARKE B, CHETTY R. Postmodern cancer: the role of human immunodeficiency virus in uterine cervical cancer. *J Clin Pathol: Mol Pathol*. 2002; 55:19-24.
- 6 - CARVALHO MO, CARESTIATO FN, PERDIGÃO PH, XAVIER MP, SILVA K, BOTELHO MO, OLIVEIRA LH, CAVALCANTI SM. Human papillomavirus infection in Rio de Janeiro, Brazil: a retrospective study. *Braz J Infect Dis*. 2005; 9(5):398-404.
- 7 - SIRERA G, VIDELA S, HERRANZ P., CORZO-DELGADO JE, POR EL GRUPO DE ESTUDIO DEL SIDA (GESIDA). Virus del papiloma humano y virus de la inmunodeficiencia humana/sida. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006; 24(Supl. 2):40-7.
- 8 - VOLKOW P, RUBI S, LIZANO M, CARRILLO A, VILAR-COMPTE D, GARCÍA-CARRANCÁ A, et al. High Prevalence of Oncogenic Human Papillomavirus in the Genital Tract of Women with Human Immunodeficiency Virus. *Gynecologic Oncology*. 2001; 82:27-31.
- 9 - LEVI JE, KLETER B, QUINT WGV, FINK MCS, CANTO CLM, MATSUBARA R, 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*. 2002; 40(9):3341-3345.
- 10 - NINDL I, RINDFLEISCH K, LOTZ B, SCHNEIDER A, DÜRST M. Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer. *Int J Cancer*. 1999; 82:203-207.
- 11 - BERNARD HU, CHAN SY, MANOS MM, ONG CK, VILLA LL, DELIUS H, et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis*. 1994; 170:1077-1085.

- 12 - CAMARA GNNL, CERQUEIRA DM, OLIVEIRA APG, SILVA EO, BONFIM PR, CARVALHO LGS, et al. Prevalence of Human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions in Central Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003; 98(7):879-883.
- 13 - CERQUEIRA DM, CAMARA GNN, CRUZ MR, SILVA EO, BRÍGIDO MM, CARVALHO LGS, et al. Variants of Human Papillomavirus Types 53, 58 and 66 Identified in Central Brazil. *Virus Genes*. 2003; 26(1):83-87.
- 14 - TROTTIER H, FRANCO EL. Human papillomavirus and cervical cancer: burden of illness and basis for prevention. *Am J Manag Care*. 2006; 12(17 Suppl):S462-72.
- 15 - BOSCH FX, QIAO Y-L, CASTELLSAGUÉ X. The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2006; 94(Supplement 1):S8-S21.
- 16 - CHATURVEDI AK, DUMESTRE J, GAFFGA AM, MIRE KM, CLARK RA, BRALY PS, et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes in women from three clinical settings. *J Med Virol*. 2005; 75:105–113.
- 17 - TORNESELLO ML, DURATURO ML, BUONAGURO L, VALLEFUOCO G, PICCOLI R, PALMIERI S et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes and their variants in high risk West Africa women immigrants in South Italy. *Infectious Agents and Cancer*. 2007; 2:1.
- 18 - LEVI JE, FERNANDES S, TATENO AF, MOTTA E, LIMA LP, ELUF-NETO J, et al. Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. *Gynecol Oncol*. 2004; 92:225-231.
- 19 - CLIFFORD GM, GALLUS S, HERRERO R, MUÑOZ N, SNIJDERS PJF, VACCARELLA S, 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*. 2005; 366:991–98.

- 20 - TORNESELLO ML, DURATURO ML, BOTTI G, GREGGI S, PICCOLI R, DE PALO G et al. Prevalence of alpha-papillomavirus genotypes in cervical squamous intraepithelial lesions and invasive cervical carcinoma in the Italian population. *J Med Virol.* 2006; 78(12):1663-72.
- 21 - BURD EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiology reviews.* 2003; 16(1):1-17.
- 22 - EVANS MF, ADAMSON CS, PAPILO JL, ST JOHN TL, LEIMAN G, COOPER K. Distribution of human papillomavirus types in ThinPrep Papanicolaou tests classified according to the Bethesda 2001 terminology and correlations with patient age and biopsy outcomes. *Cancer.* 2006; 106(5):1054-64.
- 23 - ANDERSSON S, DILLNER L, ELFGREN K, MINTS M, PERSSON M, RYLANDER E. A comparison of the human papillomavirus test and Papanicolaou smear as a second screening method for women with minor cytological abnormalities. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2005; 84(10):996-1000.
- 24 - COX JT, AMERICAN SOCIETY FOR COLPOSCOPY AND CERVICAL PATHOLOGY. The clinician's view: role of human papillomavirus testing in the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology Guidelines for the management of abnormal cervical cytology and cervical cancer precursors. *Arch Pathol Lab Med.* 2003; 127(8):950-8.
- 25 - PALEFSKY JM. HPV infection and HPV-associated neoplasia in immunocompromised women. *International Journal of Gynecology and Obstetrics.* 2006; 94(Supplement 1):S56-S64.
- 26 - LUQUE AE, DEMETER LM, REICHMAN RC. Association of Human Papillomavirus Infection and Disease with Magnitude of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) RNA Plasma Level among Women with HIV-1 Infection. *The Journal of Infectious Diseases.* 1999; 179:1405-1409.

Amostra / Data da Coleta	PCR	Citopatologia	CD4 células/ $\mu$ L	Carga Viral Cópias RNA/mL	Genótipo do HPV	Risco	Infecção múltipla	Anti- retrovirais	Idade
Bsb 01 07/06/04	-	Normal	361	9664				Ø	30
Bsb 02 09/06/04	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas; inflamação	506	721				Ø	31
Bsb 04 09/06/04	+	Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau	81	28053	81	Baixo	sim	AZT + 3TC + NFV	43
Bsb 05 14/06/04	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	113	24779	62	Baixo	não	AZT + 3TC + EFV	41
Bsb 06 16/06/04	-	Normal	510	< L Mín				AZT + ddI + EFV	37
Bsb 07 16/06/04	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas; inflamação; metaplasia escamosa	371	< L Mín				AZT + 3TC + EFV	35
Bsb 08 16/06/04	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas; inflamação	190	< L Mín	56	Alto	não	AZT + 3TC + IDV + RTV	48
Bsb 09 24/08/04	+	NIC II	700	< L Mín	70	Alto	não	Ø	53
Bsb 12 14/09/04	+	NIC III	74	32000	81	Baixo	sim	AZT + 3TC + NVP	31
Bsb 13 16/09/04	+	ASCUS	361	27936	6b	Baixo	não	Ø	28
Bsb 14 13/10/04	+	Efeito citopático compatível com HPV + NIC II (displasia moderada)	268	251162	16	Alto	não	Ø	33
Bsb 15 13/10/04	+	Normal	26	62425	52	Alto	não	RTV, 3TC, SQV, TDF	47
Bsb 16 20/10/04	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	744	< L min				SQV, RTV, d4T, 3TC	41
Bsb 17 27/10/04	-	Normal	655	< L Min				AZT, ddI, IDV	35
Bsb 18 27/10/04	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	415	< L Min				3TC, NFV, d4T	30
Bsb 19 27/10/04	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	592	130	70	Alto	não	ATZ, NVP	31
Bsb 20 27/10/04	+	Efeito citoapático compatível com HPV;	24	150783	11+52	Alto + Baixo	sim	AZT, 3TC, EFV	36

		inflamação; metaplasia escamosa							
Bsb 21 27/10/04	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	626	< L Min				ATZ, AZT, 3TC	48
Bsb 22 27/10/04	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação, metaplasia escamosa	319	18184				d4T, 3TC, NVP	33
Bsb 23 27/10/04	+	Normal	529	9935	33	Alto	não	∅	24
Bsb 24 03/11/04	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: metaplasia escamosa + efeito citopático compatível com HPV + NIC II (displasia moderada)	305	9394	33+66	Alto	sim	∅	29
Bsb 25 03/11/04	-	Normal	493	58959				∅	34
Bsb 26 03/11/04	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação, metaplasia escamosa	449	115	56	Alto	Não	d4T, 3TC, NFV	31
Bsb 27 03/11/04	+	Efeito citopático compatível com HPV + NIC II (displasia moderada)	195	412	18	Alto	não	d4T, 3TC, EFV	26
Bsb 28 03/11/04	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação, metaplasia escamosa + efeito citopático compatível com HPV	366	< L Min	59	Alto	não	TDF, 3TC, NFV	46
Bsb 29 03/11/04	-	Normal	982	< L Min				∅	22
Bsb 31 03/11/04	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: metaplasia escamosa + efeito citopático compatível com HPV	429	20466	33	Alto	não	∅	25
Bsb 32 10/11/04	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	518	1991	81	Baixo	não	3TC, d4T, NFV	44
Bsb 33 23/11/04	+	Efeito citopático compátivel com HPV; NIC II	280	< L Min	53	Alto	não	3TC, AZT, EFV	42
Bsb 34	+	Alterações celulares	365	780	62	Baixo	não	∅	31

24/11/04		benignas reativas ou reparativas: inflamação							
Bsb 35 24/11/04	-	Normal	648	13016				∅	32
Bsb 37 24/11/04	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas; inflamação, metaplasia escamosa	208	4364				AZT, 3TC, EFV	55
Bsb 38 24/11/04	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	543	< L Min				AZT, 3TC, NVP	41
Bsb 40 24/11/04	-	Normal	282	< L Min				AZT, 3TC, EFV	30
Bsb 41 24/11/04	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação, metaplasia escamosa	226	14158	66	Alto	não	AZT, 3TC, NVP	39
Bsb 42 24/11/04	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	494	10754				∅	23
Bsb 43 01/12/04	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação, metaplasia escamosa	388	478				AZT, 3TC, NFV	25
Bsb 44 01/12/04	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação, metaplasia escamosa	282	799				AZT, 3TC, NVP	35
Bsb 45 01/12/04	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação, metaplasia escamosa + NIC I (displasia leve)	391	256	11	Baixo	sim	d4T, RTV, EFV, ATZ	33
Bsb 46 01/12/04	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação, metaplasia escamosa	1322	70				∅	40
Bsb 47 01/12/04	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação, metaplasia escamosa	543	3657	6b	Baixo	não	∅	20
Bsb 48 01/12/04	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas:	311	< L Min	18+81+66	Alto + Baixo	sim	ATZ, LPV	49



		inflamação, metaplasia escamosa							
Bsb 49 01/12/04	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação, metaplasia escamosa	406	137688	61+85	Alto + Baixo	sim	Ø	26
Bsb 50 01/12/04	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação, metaplasia escamosa	560	< L Min	81	Baixo	sim	ddI, d4T, LPV, RTV	29
Bsb 51 08/12/04	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: atrofia com inflamação	262 / mm <sup>3</sup>	3664				ATZ, NFV	61
Bsb 53 08/12/04	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	949	262				AZT, 3TC, NVP	30
Bsb 54 08/12/04	-	Normal	1307	1284				Ø	36
Bsb 55 08/12/04	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	567	23118				Ø	31
Bsb 56 08/12/04	+	Alterações em células epiteliais: em células escamosas – atípicas de significado indeterminado (ASCUS)	697	< L Min	35	Alto	não	AZT, 3TC, NFV	24
Bsb 57 15/12/04	+	Efeito citopático compatível com HPV	723	2088	71	Baixo	sim	3TC, d4T, EFV	42
Bsb 58 15/12/04	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação, metaplasia escamosa	207	58833				Ø	50
Bsb 59 15/12/04	+	Efeito citopático compatível com HPV + NIC III (displasia acentuada, carcinoma in situ)	554	8518	35	Alto	não	TDF, 3TC, LPV/R	27
Bsb 60 15/12/04	-	Normal (15/12/04)	222	109515				IDV, AZT, 3TC	30
Bsb 61 15/12/04	-	Dentro dos limites da normalidade	372	< L Min				AZT, ddI, NVP	38
Bsb 62 15/12/04	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	252	82563	67	Alto	não	ddI, LPV, TDF	31
Bsb 64 22/12/04	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas:	363	29349				Ø	40

inflamação									
Bsb 65 22/12/04	+	Efeito citopático compatível com HPV + NIC I (displasia leve)	115	33298	70	Alto	não	∅	43
Bsb 66 22/12/04	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação, metaplasia escamosa	746	5273				∅	34
Bsb 67 12/01/2005	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	456	4079				ddI, d4T, NFV	32
Bsb 68 13/01/2005	+	Efeito citopático compatível com HPV	443	< L Min	16	Alto	não	d4T, 3TC, EFV	27
Bsb 69 19/01/2005	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	928	< L Min				∅	38
Bsb 70 19/01/2005	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação, metaplasia escamosa	333	24727				∅	35
Bsb 72 26/01/2005	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação, metaplasia escamosa	223	7322				AZT, 3TC, NVP	34
Bsb 73 26/01/2005	+	Normal	413	< L Min	52	Alto	não	AZT, 3TC, NVP	49
Bsb 74 26/01/2005	+	Alterações celulares reativas e/ou reparativas: inflamação	723	3760	35	Alto	não	∅	44
Bsb 75 26/01/05	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	320	4386	16	Alto	não	AZT, ddI, EFV	27
Bsb 76 26/01/2005	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	728	< L Min				AZT, 3TC, NVP	48
Bsb 77 26/01/2005	+	Normal	929	< L Min	102	Baixo	não	TDF, 3TC, EFV	27
Bsb 78 16/02/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	200	< L Min				AZT, 3TC, EFV	27
Bsb 79 16/02/05	-	Normal	998	11596				∅	38
Bsb 80 16/02/05	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas:	306	12025	56	Alto	não	∅	24

inflamação									
Bsb 81 16/02/05	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação, metaplasia escamosa	261	< L Min	81	Baixo	não	AZT, 3TC, NVP	37
Bsb 82 23/02/05	+	Normal	532	81438	18+35	Alto	sim	∅	36
Bsb 83 23/02/05	-	Normal	554	354				AZT, ddI, NFV	40
Bsb 84 23/02/05	-	Normal	136	< L Min				d4T, 3TC, EFV	33
Bsb 85 23/02/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	348	23322				∅	27
Bsb 86 23/02/05	+	Alterações em células epiteliais: em células escamosas - efeito citopático compatível com HPV	191	< L Min	52	Alto	não	AZT, 3TC	25
Bsb 87 23/02/05	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	421	< L Min	16+62+81	Alto + Baixo	sim	ATZ, NVP	26
Bsb 88 23/02/05	-	Normal	216	40128				∅	35
Bsb 89 23/02/05	+	Alteração citopatológica compatível com infecção por HPV + lesão intraepitelial escamosa de baixo grau	70	66681	58	Alto	não	AZT, 3TC, EFV	26
Bsb 90 02/03/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: atrofia com inflamação	486	< L Min				d4T, 3TC, NVP	56
Bsb 91 02/03/05	+	Alterações em células epiteliais: em células escamosas – efeito citopático compatível com HPV; em células escamosas - NIC I (displasia leve)	319	12314	39	Alto	Não	d4T, ddI, ATZ	26
Bsb 92 02/03/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	138	4151				∅	41
Bsb 93 02/03/05	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação, metaplasia escamosa	492	89	81	Baixo	não	∅	46
Bsb 94	-	Alterações celulares	794	51				∅	32

02/03/05		benignas reativas ou reparativas: inflamação							
Bsb 95 10/03/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	307	27320				d4T, 3TC, IDV, RTV	40
Bsb 97 10/03/05	+	Normal	282	267	81	Baixo	não	AZT, 3TC, NVP	42
Bsb 98 10/03/05	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação; alterações em células epiteliais: em células escamosas - NIC III (displasia acentuada/carcinoma in situ)	257	< L Min	16+33+39	Alto	sim	ddI, AZT, ATZ	25
Bsb 99 10/03/05	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	666	123	68+81	Alto + Baixo	sim	TDF, AZT, 3TC, ATZ/RTV	34
Bsb 100 10/03/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação, metaplasia escamosa	237	3777				AZT, 3TC, EFZ	32
Bsb 101 16/03/05	+	Normal	424	9465	40	Baixo	não	NVP + AZT + 3TC	32
Bsb 102 23/03/05	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	231	< L Min	62	Baixo	não	AZT + 3TC + EFV	31
Bsb 103 31/03/05	-	Normal	588	3083				∅	38
Bsb 104 31/03/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	557	< L Min				AZT + 3TC + NVP	32
Bsb 105 07/04/05	-	Normal	609	< L Min				AZT, ddI, ATZ	47
Bsb 106 07/04/05	+	Alterações em células epiteliais: em células escamosas – NIC III (displasia acentuada/carcinoma in situ)	268	< L Min	40	Baixo	não	AZT, 3TC, EFV	39
Bsb 107 07/04/05	+	Normal	900	135	66	Alto	não	∅	29
Bsb 108 14/04/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação, metaplasia escamosa	374	6211				∅	38

Bsb 109 14/04/05	-	Normal	1290	4556				∅	17
Bsb 111 14/04/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação, metaplasia escamosa	164	6422				AZT, 3TC, EFV	32
Bsb 113 20/04/05	+	Normal	353	161121	16	Alto	não	∅	25
Bsb 115 28/04/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	330	1213				AZT, 3TC, NFV	29
Bsb 116 28/04/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	328	< L Min				ATZ, EFV, TDF, LPV	43
Bsb 117 28/04/05	-	Normal	401	< L Min				AZT, 3TC, EFV	36
Bsb 118 28/04/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	631	< L Min				AZT, ddI, IDV	49
Bsb 120 04/05/05	-	Normal	500	< L Min				3TC, EFV	34
Bsb 121 05/05/05	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação; alterações em células epiteliais: em células escamosas – efeito citopático compatível com HPV, NIC I (displasia leve)	205	> L Max (500000)	35	Alto	sim	AZT, 3TC, ATZ	24
Bsb 122 05/05/05	-	Normal	413	< L Min				AZT, 3TC, EFV	39
Bsb 123 05/05/05	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação, metaplasia escamosa; alterações em células epiteliais: em células escamosas – efeito citopático compatível com HPV, NIC III (displasia acentuada/carcinoma in situ)	241	< L Min	56	Alto	sim	AZT, 3TC, ATZ	32
Bsb 124 05/05/05	-	Normal	741	< L Min				d4T, 3TC, NFV	28
Bsb 125 05/05/05	-	Normal	280	< L Min				d4T, 3TC, NFV	32
Bsb 126	+	Alterações celulares	116	138	16+52	Alto	sim	AZT, 3TC,	33

05/05/05		benignas reativas ou reparativas: inflamação						LPV	
Bsb 127 11/05/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação, metaplasia escamosa	536	< L Min				d4T, IDV, 3TC, NVP	38
Bsb 128 19/05/05	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação; alterações em células epiteliais: em células escamosas – efeito citopático compatível com HPV	312	7252	53+58	Alto	Sim	∅	28
Bsb 129 19/05/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	461	< L Min				AZT, 3TC, EFV	41
Bsb 130 19/05/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	357	14063				∅	29
Bsb 131 02/06/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	317	60				TDF, 3TC, LPV	35
Bsb 132 02/06/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	515	< L Min				ATZ, NVP	36
Bsb 133 02/06/05	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação; alterações em células epiteliais: em células escamosas – NIC I (displasia leve)	274	12390	31	Alto	não	∅	38
Bsb 134 02/06/05	-	Normal	772	< L Min				AZT, 3TC, ATZ	49
Bsb 136 02/06/05	-	Normal	474	887				AZT, ddI, NVP	36
Bsb 137 02/06/05	-	Normal	284	96176				∅	29
Bsb 138 09/06/05	-	Normal	357	< L Min				ddI, 3TC, NFV	53
Bsb 139 09/06/05	-	Normal	128	28315				TDF, 3TC, d4T, ATZ/R	46
Bsb 140 09/06/05	+	Alterações em células epiteliais: em células escamosas – efeito citopático compatível	644	76919	31	Alto	não	∅	24

		com HPV; em células escamosas – NIC II (displasia moderada)							
Bsb 141 16/06/05	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação leve	355	< L Min	32+53+62	Alto	sim	AZT, 3TC, EFV	37
Bsb 142 16/06/05	-	Alterações em células epiteliais: em células escamosas – atipias de significado indeterminado; ASCUS favorecendo HPV	172	1964				∅	31
Bsb 143 23/06/05	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	677	< L Min	16	Alto	não	AZT, 3TC, EFV	27
Bsb 144 23/06/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	341	16517				∅	39
Bsb 145 23/06/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação, reparo glandular	285	< L Min				AZT, ddI, EFV	30
Bsb 146 30/06/05	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação, metaplasia escamosa, reparação	459	3497	71	Baixo	não	ddI, 3TC, LPV	42
Bsb 147 30/06/05	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação; alterações em células epiteliais: em células escamosas – efeito citopático compatível com HPV	212	16040	61	Baixo	não	AZT, 3TC, EFV	23
Bsb 148 30/06/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação, metaplasia escamosa	559	2574				∅	27
Bsb 150 14/07/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	681	8009				∅	30
Bsb 151 14/07/05	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	415	1487	54	Baixo	sim	TDF, 3TC, EFV, ATZr	37

Bsb 152 14/07/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	260	15816				AZT, 3TC, ATZ	38
Bsb 153 14/07/05	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	208	1981	53	Alto	não	∅	37
Bsb 154 25/08/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	183	1086				d4T, 3TC, NVP	41
Bsb 155 25/08/05	-	Normal	491	15738			não	∅	31
Bsb 156 25/08/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	325	2420			não	∅	29
Bsb 157 01/09/05	-	Normal	284	6868			não	ddI, d4T, NFV	42
Bsb 158 01/09/05	-	Normal	558	< L Min				d4T, 3TC, LPV/RTV	30
Bsb 159 22/09/05	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	395	58501	31	Alto	não	∅	34
Bsb 160 22/09/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	180	< L Min				ATZ, EFV	42
Bsb 161 22/09/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	466	< L Min				TDF, 3TC, LPV/RTV, ATZ	45
Bsb 162 22/09/05	+	Alterações em células epiteliais: em células escamosas – efeito citopático compatível com HPV; em células escamosas – NIC III (displasia acentuada/carcinoma in situ)	2	403467	16+70	Alto	sim	d4T, 3TC, LPV	36
Bsb 163 22/09/05	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	533	< L Min	52+58	Alto	sim	AZT, 3TC, EFZ	54
Bsb 164 29/09/05	+	Alterações em células epiteliais: em células escamosas – efeito citopático compatível com HPV; NIC I (displasia leve)	442	110	16	Alto	não	NVP, 3TC	36
Bsb 165 29/09/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou	580	< L Min				TDF, 3TC, LPVr	36



		reparativas: inflamação							
Bsb 166 06/10/05	-	Normal	156	15136				∅	26
Bsb 167 06/10/05	-	Normal	448	77				AZT, ddI, EFV	38
Bsb 168 13/10/05	-	Alterações em células epiteliais: em células escamosas – efeito citopático compatível com HPV	448	< L Min				AZT, 3TC, EFV	39
Bsb 169 13/10/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	471	< L Min				AZT, 3TC, EFV	38
Bsb 170 13/10/05	-	Normal	305	23329				ATC, NVP	37
Bsb 171 13/10/05	-	Normal	428	< L Min				AZT, 3TC, EFV	40
Bsb 172 20/10/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	212	3666				AZT, 3TC, NVP	47
Bsb 173 20/10/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	537	< L Min				ATC, ATZ	46
Bsb 174 20/10/05	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	416	2251	70	Alto	não	d4T, 3TC	54
Bsb 175 20/10/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	215	8613				∅	27
Bsb 176 27/10/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação, metaplasia escamosa	416	4450				∅	25
Bsb 177 27/10/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	449	< L Min				AZT, 3TC, NFV	29
Bsb 178 27/10/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	310	3555				∅	34
Bsb 179 03/11/05	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	248	< L Min				AZT, 3TC, ATZ	59
Bsb 180 23/03/06	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas:	435	< L Min	53	Alto	Não	ATC, NFV	50

		inflamação, metaplasia escamosa							
Bsb 181 23/03/06	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	405	< L Min				AZT + 3TC + NVP	37
Bsb 185 30/03/06	+	Alterações em células epiteliais: em células escamosas – NIC III (displasia acentuada/carcinoma in situ)	149	144831	35+58	Alto	sim	ATC, NLF	53
Bsb 186 06/04/06	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: metaplasia escamosa	1053	< L Min				ATC, ATV	35
Bsb 187 20/04/06	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação, metaplasia escamosa	620	< L Min				ATC, EFV	37
Bsb 188 20/04/06	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: atrofia com inflamação	499	< L Min				ATC, EFV	48
Bsb 189 20/04/06	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	519	11682				∅	39
Bsb 190 20/04/06	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	158	< L Min				3TC, TFV, ATV	42
Bsb 192 27/04/06	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	181	26596				∅	32
Bsb 193 27/04/06	+	Alterações em células epiteliais: em células escamosas – efeito citopático compatível com HPV; NIC II (displasia moderada)	169	3736	31+33	Alto	sim	d4T, 3TC, NFV	29
Bsb 194 11/05/06	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	556	599				ATZ, AZT, 3TC	37
Bsb 195 11/05/06	-	Alterações em células epiteliais: em células escamosas – efeito citopático compatível com HPV	324	74				ATV, TFV, 3TC	39
Bsb 196 11/05/06	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: atrofia	115	< L Min				ATC, EFV	40

com inflamação									
Bsb 197 25/05/06	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	483	< L Min				ATC, RTV, ATV	48
Bsb 198 25/05/06	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	154	20274	66	Alto	não	ATC, NFV	36
Bsb 199 25/05/06	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	319	25468	52	Alto	não	∅	27
Bsb 200 25/05/06	+	Normal	535	4936	62	Baixo	não	∅	49
Bsb 201 01/06/06	-	Normal	463	< L Min				AZT, 3TC, EFV	26
Bsb 202 01/06/06	+	Atipias em células escamosas: lesão intra-epitelial de baixo grau (compreendendo efeito citopático pelo HPV e neoplasia intra-epitelial cervical grau I)	315	< L Min	58	Alto	não	ATC, LPV	40
Bsb 203 01/06/06	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	143	11870				d4T, 3TC, NFV	39
Bsb 204 01/06/06	+	Atipias em células escamosas: lesão intra-epitelial de baixo grau (compreendendo efeito citopático pelo HPV e neoplasia intra-epitelial cervical grau I)	402	< L Min	58	Alto	não	d4T, 3TC, RTV, SQV	36
Bsb 205 22/06/06	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	251	997				d4T, 3TC, ATV, RTV	39
Bsb 206 29/06/06	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	407	4341	18	Alto	não	∅	24
Bsb 207 29/06/06	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	64	277				d4T, 3TC, NFV	52
Bsb 208 29/06/06	-	Normal	483	13702				∅	42
Bsb 209 29/09/06	-	Alterações celulares benignas reativas ou	417	78473				∅	40

		reparativas: inflamação							
Bsb 210 15/09/06	+	Atipias em células escamosas: lesão intra-epitelial de baixo grau (efeito citopático pelo HPV e NIC I)	114	4298	52+61	Alto + Baixo	sim	ATC, NFV	32
Bsb 211 05/10/06	+	Normal	627	< L Min	72	Baixo	não	ATZ, AZT	32
Bsb 212 05/10/06	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	1336	102				∅	21
Bsb 213 05/10/06	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	807	3959				∅	36
Bsb 214 9/11/06	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	371	7312	61	Baixo	não	ATC, NVP	40
Bsb 215 9/11/06	+	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	95	18869	53	Alto	sim	TFV, ATC, LPV	44
Bsb 216 7/12/06	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	564	< L Min				ATC, EFV	30
Bsb 217 14/12/06	+	Alterações celulares não-neoplásicas – reativas ou reparativas associadas à inflamação (reparo típico)	270	1108	54+70+71	Alto	sim	3TC, LPV, TFV, ATV	34
Bsb 218 14/12/06	-	Normal	436	133443				ATC, EFV	38
Bsb 219 14/12/06	-	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas: inflamação	260	706				ATC, NLP	29
Bsb 220 14/12/06	-	Células atípicas de significado indeterminado escamosas: possivelmente não neoplásicas	858	< L Min				3TC, EFV, ABC	30

NIC: neoplasia intra-epitelial cervical

ASCUS: células escamosas atípicas de significado indeterminado

< L Min: menos de 50 cópias de RNA do HIV / mL (indetectável); > L Max: mais de 500000 cópias de RNA do HIV / mL

ABC: abacavir; ATZ: atazanavir; AZT: zidovudina; d4T: estavudina; ddI: didanosina; ddC: zalcitabina; DLV: delavirdina; EFV: efavirenz; IDV: indinavir; LPV: lopinavir; NFV: nelfinavir; NVP: nevirapina; RTV: ritonavir; SQV: saquinavir; 3TC: lamivudina; TDF: tenofovir.