

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
TROPICAL**

Andrea Alves Ribeiro

Prevalência de tipos específicos de Papilomavírus humano (HPV) e relação com a severidade da lesão cervical em mulheres com exame citopatológico anormal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Rabelo dos Santos

Dissertação de Mestrado

Goiânia-GO, 2009



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás-UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor(a):	Andrea Alves Ribeiro		
CPF:	856361691-91	E-mail:	andrea_cito@yahoo.com.br
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? <input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não			
Vínculo Empregatício do autor			
Agência de fomento:		Sigla:	
País:		UF:	
		CNPJ:	
Título:	Prevalência de tipos específicos de Papilomavírus humano (HPV) e relação com a severidade da lesão cervical em mulheres com exame citopatológico anormal		
Palavras-chave:	Papilomavírus humano, diagnósticos neoplásicos, neoplasia intra-epitelial cervical, infecção simples, infecções por múltiplos tipos		
Título em outra língua:	Prevalence of specific types of Human papillomavirus (HPV) and related to the severity of cervical lesions in women with abnormal Pap smear		
Palavras-chave em outra língua:	Human papillomavirus, neoplastic diagnosis, cervical intraepithelial neoplasia, single infection, multiple-type infections		
Área de concentração:	Microbiologia		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	15/12/2009		
Programa de Pós-Graduação:	Medicina Tropical e Saúde Pública		
Orientador(a):	Silvia Helena Rabelo dos Santos		
CPF:	375166551-04	E-mail:	silvia.rabelo@pq.cnpq.br

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ total parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

Capítulos. Especifique: _____

Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Andrea Alves Ribeiro
Assinatura do(a) autor(a)

Data: 03/06/2011

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
TROPICAL**

Andrea Alves Ribeiro

Prevalência de tipos específicos de Papilomavírus humano (HPV) e relação com a severidade da lesão cervical em mulheres com exame citopatológico anormal

Orientadora: Prof^a. Dr^a.Silvia Helena Rabelo dos Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Tropical.

Goiânia-GO, 2009

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

R484p Ribeiro, Andrea Alves.
Prevalência de tipos específicos de Papilomavírus humano (HPV) e relação com a severidade da lesão cervical em mulheres com exame citopatológico anormal [manuscrito] / Andrea Alves Ribeiro. - 2009.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Rabelo dos Santos.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2009.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Anexos.

1. Papilomavírus humano – (HPV). 2. Neoplasia -Diagnóstico.
3. Neoplasia intra-epitelial cervical. 4. Infecção simples. I. Título.

CDU: 616.9:618.14-006

Dedico este trabalho a meus pais pelo apoio
e por tornarem tudo isso possível.

Agradecimentos

À Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Rabelo dos Santos pela oportunidade e ensinamentos prestados.

À Prof^a. Dr^a. Megmar Aparecida dos Santos Carneiro pela dedicação irrestrita.

À Prof^a. Dr^a. Rosane Ribeiro Figueiredo Alves pelo conhecimento adquirido a respeito da clínica médica.

À Nadja Lindany Alves de Sousa Araújo pela amizade e colaboração nas análises citológicas.

À Maria de Lourdes Siqueira no suporte técnico e, claro, pela amizade e conversas nos momentos de descontração.

À Suelene Brito do Nascimento Tavares pela colaboração nas análises citológicas e disponibilidade sempre que solicitada.

Aos meus pais pela minha formação, por eu ser o que sou.

A minha irmã Jaqueline por poder dividir este momento e me socorrer em todas as horas.

Aos colegas do programa de pós-graduação, especialmente a Narriman Kennia Barros, pelo companheirismo.

A todos do Centro de Análises Clínicas Rômulo Rocha, pelo respeito e colaboração.

Aos secretários do curso de pós-graduação do IPTSP, Zezinho e Kariny, pela atenção e assistência prestadas.

Aos funcionários da Santa Casa de Misericórdia, em especial às enfermeiras, pela colaboração na realização do procedimento ambulatorial.

Às mulheres que gentilmente aceitaram participar da pesquisa, pois sem elas nada seria possível.

A Capes, pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

“A mente que se abre a uma
nova idéia jamais retorna ao
seu tamanho original”.
Albert Einstein

Lista de abreviaturas

A	Alpha (do gênero <i>Alphapapillomavirus</i>)
ALTS	<i>Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
°C	Graus Celsius
CH2	Captura Híbrida 2
E	Precoce (<i>early</i>)
ELISA	<i>Enzyme-liked immunosorbent assay</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ Hybridization</i>
G	Aceleração da gravidade
GP5+/GP6+.	Primers de consenso
HR	Alto Risco (<i>High risk</i>)
HPV	Papilomavírus humano (<i>Human papillomavirus</i>)
hTERT	Subunidade catalítica da enzima telomerase
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus
MY09/MY11	Primers de consenso
INCA	Instituto Nacional do Câncer
L	Tardia (<i>late</i>)
LR	Baixo Risco (<i>Low risk</i>)
NIC	Neoplasia intra-epitelial cervical
ORF	Região Aberta de Leitura (<i>open reading frames</i>)
pb	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-RFLP	Reação em Cadeia da Polimerase por Comprimento do Fragmento de Restrição
pRb	Proteína do retinoblastoma
p53	Proteína 53
p300	Proteína de 300kDa

p600	Proteína de 600 kDa
p/CAF	P300 fator associado
SIL	Lesão Intra-epitelial escamosa (<i>squamous intraepithelial lesions</i>)
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
SCC	<i>Squamous Cell Carcinoma</i> (Carcinoma escamoso)
SPF1/2	Primers de consenso
TE	Tris-EDTA
URR	Região Regulatória (<i>upstream regulatory region</i>)
VLP	Partícula Semelhante a Vírus (<i>Viurus Like Particle</i>)
WHO	Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization</i>)

Lista de figuras e quadros

	Pág.
Figura 1 Representação esquemática do HPV	21
Figura 2 Árvore filogenética do papilomavírus.....	23
Figura 3 Técnica de hibridização reversa em pontos	32
Figura 4 Revelação dos tipos específicos de HPV	32
Quadro1 Classificação filogenética das espécies de HPV do gênero <i>Alphapapillomavirus</i>	24

Lista de tabelas do artigo

Table 1 HPV genotypes prevalence and histological diagnosis 60

Table 2 Association of HPV genotypes in single or multiple infections and
histological diagnosis 61

Table 3 Association of HPV 16 and HPV 18 in single or multiple infections
and histological diagnosis..... 62

Table 4 Association of HPV types and groups according to histological diagnosis
..... 63

Estrutura da Dissertação

Esta dissertação está sendo apresentada no formato alternativo de disponibilização de dissertações de mestrado e teses de doutorado no IPTSP/UFG e de acordo com o disposto em “Normas, Coordenadoria de Pós-Graduação em Medicina Tropical (CPGMT) da Universidade Federal de Goiás N° 01” (2005).

Inclui uma introdução sobre o tema, os objetivos da dissertação, um artigo original a ser submetido ao *International Journal of Gynecological Pathology* com a descrição dos métodos, resultados obtidos, discussão e, por fim, conclusão e anexos. Nos anexos foram incluídos os modelos do termo de Consentimento livre e esclarecido (TCLE), cópia da ficha utilizada para coleta de dados e cópia do documento de aprovação no Comitê de Ética da Santa Casa de Misericórdia de Goiânia.

As etapas e experimentos necessários ao desenvolvimento desta pesquisa foram realizados nos seguintes locais:

- ❖ Ambulatório de Patologia Cervical do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Goiânia
- ❖ Centro de Análises Clínicas Rômulo Rocha da Faculdade de Farmácia da UFG
- ❖ Laboratório Anátomo-patológico do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Goiânia
- ❖ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública- IPTSP/UFG
- ❖ Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
- ❖ Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer – São Paulo

Resumo

O Papilomavírus humano (HPV) é considerado o agente etiológico central envolvido na gênese do câncer cervical. O vírus HPV é classificado de acordo com seu nicho biológico, potencial oncogênico e classificação filogenética. De acordo com os critérios estabelecidos pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV), os diversos tipos de HPV que infectam o trato genital feminino são classificados filogeneticamente no gênero *Alphapapillomavirus*. Esta classificação inclui espécies filogenéticas classificadas entre a espécie 1 e a espécie 15, dentre as quais, as de maior interesse em relação ao potencial carcinogênico são a espécie 9 (HPV 16, 31, 33, 35, 52, 58, 67) e a espécie 7 (18, 39, 45, 56, 59, 66, 68, 70). O HPV 16 é tipo o mais predominante, independente do diagnóstico, presente principalmente nas lesões cervicais mais graves. A co-infecção com múltiplos tipos de HPV é um achado comum em muitos estudos moleculares, contudo, as interações dos genótipos virais ou espécies envolvidas nas infecções por múltiplos tipos de HPV têm sido pouco analisadas. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito das infecções simples ou por múltiplos tipos de HPV, considerando também os grupos filogenéticos, sobre a prevalência e a gravidade das neoplasias cervicais.

Metodologia: Este estudo de corte transversal incluiu 198 mulheres encaminhadas ao Ambulatório de Colposcopia da Santa Casa de Misericórdia de Goiânia por exame citopatológico anormal. Todas as mulheres foram esclarecidas quanto aos objetivos de estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. A colposcopia foi realizada em todos os casos e a biópsia em 193 das 198 mulheres

incluídas. As amostras foram testadas para 27 genótipos de HPV, por reação em cadeia da polimerase (PCR); em seguida foi realizada a hibridização reversa em pontos da Roche Diagnósticos. **Resultados:** A prevalência de HPV em mulheres encaminhadas por exame citopatológico anormal foi de 86% (171/198). Do total de mulheres HPV-positivas, 45% (77/171) estavam infectadas por HPV 16 em infecções simples e múltiplas. Os tipos de HPV 31 e 35 foram respectivamente, o segundo e o terceiro mais prevalentes. A prevalência do HPV 16 foi de 52% (40/76) nas neoplasias intra-epiteliais cervicais de alto grau (NIC 2/3) e de 88,8% (8/9) nos casos de carcinomas invasivos. As prevalências dos tipos 31 e 35 em neoplasias intra-epiteliais cervicais de alto grau (NIC 2/3) foram de 10,5% (8/76) e 6,6% (5/76), respectivamente. A infecção simples por qualquer tipo de HPV foi significativamente associada com diagnósticos neoplásicos de alto grau (\geq NIC 2). Os diagnósticos neoplásicos de alto grau (\geq NIC 2) foram significativamente associados com o HPV 16 em infecções simples ou múltiplas, mesmo depois de ajustado pela positividade para DNA de HPV. Houve significativa associação entre o HPV 16 e outros tipos da espécie 9 e os diagnósticos neoplásicos de alto grau (\geq NIC 2), mas não foi observada associação, considerando o HPV 16 e outros tipos das espécies 7 ou outros tipos de HPV. **Conclusão:** Estes resultados indicam que o HPV 16 parece ser o mais importante preditor de diagnósticos neoplásicos de alto grau. As infecções múltiplas são preditoras das neoplasias cervicais de alto grau quando o HPV 16 está presente.

Palavras chave: Papilomavírus humano, diagnósticos neoplásicos, neoplasia intra-epitelial cervical, infecção simples, infecções por múltiplos tipos.

Abstract

Human papillomavirus (HPV) is considered the central etiological agent involved in the genesis of cervical cancer. The HPV viruses are classified according to their biological niche, oncogenic potential and phylogenetic position. According to the criteria established by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), the various groups of human papillomaviruses that infect the female genital tract are classified phylogenetically in the *Alphapapillomavirus* genus, including species classified among phylogenetic species 1 and species 15. The main high risk HPV are classified in species 9 (HPV 16, 31, 33, 35, 52, 58, 67), and in species 7 (18, 39, 45, 59, 56, 66, 68 and 70). HPV 16 is the most prevalent type irrespective of diagnosis, principally in more severe lesions. Coinfection with multiple-types HPV is a common finding of many molecular studies. Some HPV types might interact or act synergistically to induce progression. Few studies have investigated the interactions of viral genotypes or species in multiple-type HPV infections. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of single or multiple-types HPV infections considering also the phylogenetic groups on the prevalence and severity of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) among women undergoing colposcopy following a abnormal cervical smear. Methodology: In this analysis, 198 women attending at the colposcopic clinic, because of an abnormal cervical smear were included. Colposcopy was carried out in all cases and biopsies were done in 193 of 198 women included. All specimens were tested for 27 HPV genotypes by Roche's polymerase chain reaction reverse line blot assay. Results: The overall prevalence of HPV in women with an abnormal cervical smear was 86% (171/198). Of the total

of HPV-positive women, 45% (77/171) were infected with HPV 16 as a single or multiple-type infections. HPV 31 and 35 were, respectively, the second and third most prevalent types. The prevalence of HPV 16 in high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2/3) was 52% (40/76) and it was detected in 88.8% (8/9) in cases of invasive carcinoma. The prevalence of type 31 and 35 in high grade CIN was respectively 10.5% (8/76) and 6.6% (5/76). Single HPV infection for any type was significantly associated with neoplastic diagnosis. High grade neoplastic diagnosis (\geq CIN2) was significantly associated with HPV 16 in single or multiple infections. Also, there was significantly association between HPV 16 and others types of specie 9 and high grade neoplastic diagnosis, but no association was observed considering the HPV 16 and other of groups of species 7 or others types. Conclusion: These results indicated that the type 16 is the most important predictor of high grade cervical neoplasia. Multiple-type infections are predictors of high grade cervical neoplasia when the type 16 is present.

Key words: Human papillomavirus, neoplastic diagnosis, cervical intraepithelial neoplasia, single infection, multiple-type infections.

Sumário

	Pág.
Resumo	xi
Abstract	xiii
1. Introdução	16
1.1 Epidemiologia do câncer do colo do útero.....	16
1.2 Papilomavírus humano: Infecções e Lesões.....	17
1.3 Estrutura do genoma do Papilomavírus humano	20
1.4 Classificação dos HPVs	22
1.5 Diagnóstico da infecção pelo HPV	25
1.6 Prevalência de tipos específicos de HPV em mulheres com ou sem lesões cervicais.....	33
1.7 Infecções simples e por múltiplos tipos de HPV.....	35
1.8 Vacinas	37
1.9 Justificativa	39
2. Objetivos.....	41
2.1 Objetivo Geral.....	41
2.2 Objetivos específicos	41
3. Publicações	42
4. Conclusões	64
5. Referências Bibliográficas	65
6. Anexos	76

1. Introdução

1.1 Epidemiologia do câncer do colo do útero

O câncer do colo do útero é a segunda causa de câncer mais comum entre as mulheres em todo mundo (WHO). Estima-se que a cada ano sejam diagnosticados cerca de 493.000 novos casos com 274.000 mortes por este tipo de neoplasia no mundo. A maioria dos casos (80%) ocorre em países em desenvolvimento (Bell et al., 2008). No Brasil, a estimativa da incidência de câncer do colo do útero para o ano de 2009 é de 18.680, com risco estimado de 19 casos a cada 100 mil mulheres. Na região Centro-Oeste, o câncer do colo do útero é o segundo mais incidente (19/100.000) (INCA).

O câncer do colo do útero é uma doença de evolução lenta, apresentando fases pré-invasivas caracterizadas por lesões conhecidas como neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC). As NIC são caracterizadas pela perda gradual de funções celulares básicas como divisão e diferenciação. As células anormais perdem gradualmente as funções de controle, de crescimento normal básico e não se diferenciam adequadamente; como consequência, há proliferação celular desordenada. Se a anormalidade progride, as células perdem gradativamente sua capacidade de diferenciação até que toda a espessura do epitélio seja composta por células indiferenciadas (DeMay, 1996).

O Papilomavírus humano (HPV) é considerado o agente etiológico central envolvido na gênese dos tumores cervicais, detectado em 99,7% dos casos de

câncer do colo do útero (Walbbomers et al., 1999). O HPV também é encontrado em mais de 85% das neoplasias intra-epiteliais cervicais de alto grau, consideradas precursoras do câncer do colo do útero (Bosch et al., 2008).

1.2 Papilomavírus humano: Infecções e Lesões

A infecção pelo HPV é a mais comum das doenças sexualmente transmissíveis (Hoory et al. 2008; Kanodia et al., 2007). Ocorre principalmente em jovens, sexualmente ativas, nos primeiros anos após a sua primeira relação sexual. A maior prevalência de HPV ocorre em mulheres com idade inferior a 25 anos; esta prevalência diminui entre os 45 e 50 anos, mas tende a aumentar após a menopausa (Fernandes et al., 2009). Outros fatores de risco que podem estar relacionados à infecção pelo HPV além do início da atividade sexual precoce são: número de parceiros sexuais, multiparidade, uso contínuo de anticoncepcionais orais e tabagismo (Ragin et al., 2008; Vaccarella et al., 2006).

Estima-se que 75% das mulheres sexualmente ativas têm ou foram expostas ao HPV em algum momento de suas vidas. Na maioria dos casos, a infecção por HPV é transitória ou latente, tornando-se indetectável dentro de 1 a 2 anos, até mesmo por diagnóstico molecular como reação da polimerase em cadeia (PCR) (Trottier & Franco, 2006).

Mulheres com teste positivo para DNA de HPV de alto risco têm quatro vezes mais chance de desenvolverem NIC 1 e 13 vezes mais chances de desenvolverem lesões de alto grau (NIC 2 ou NIC 3) quando comparadas a mulheres com teste negativo para HPV (Cavalcanti & Carestiato, 2006).

Uma vez que o HPV penetra nas células-alvo, pode permanecer latente ou adotar a replicação no núcleo, que termina na síntese e liberação de partículas virais infectantes por células mais amadurecidas (Woodman et al., 2007; Alvarenga et al., 2000).

A regressão espontânea é freqüente entre as mulheres com idade inferior a 35 anos. Nesses casos, a infecção pelo HPV é transitória, a maioria provavelmente porque a célula da mulher mediada pelo sistema imunológico é capaz de erradicar a infecção. A resolução da infecção pelo HPV está relacionada a mecanismos imunológicos humorais e celulares e também a fatores nutricionais, como as vitaminas A, incluindo os carotenóides, e vitamina E, que funcionam como antioxidantes em sistemas biológicos (Rosa et al., 2009). A persistência da infecção, definida como a detecção de um mesmo tipo de HPV duas vezes em certo período, em média de 6-12 meses, é necessária para o desenvolvimento das NIC. As infecções persistentes são mais freqüentes nas mulheres acima de 35 anos e possuem maior potencial de progressão para NIC de alto grau (Brenna & Syrjäen, 2003).

As NIC podem regredir, persistir ou progredir para carcinomas invasivos. O período de evolução de uma NIC para o carcinoma invasivo é de aproximadamente 12 a 15 anos (Insinga et al., 2009; Snijders et al., 2006). As taxas de regressão espontânea entre as mulheres infectadas pelo HPV variam de 56,7%, 50,4% e 12,2% nas NIC 1, 2 e 3, respectivamente. A progressão para carcinoma invasivos nas mulheres positivas para HPV é de 14,2%, 22,4% e 64% nas NIC 1, 2 e 3, respectivamente (Brenna & Syrjäen, 2003).

Para que haja progressão para câncer invasivo, é necessário que haja infecção persistente, bem como a expressão contínua de alguns genes virais. As atividades das proteínas de HPV de alto risco E6 e E7 podem explicar parte da probabilidade para progressão (Hoory et al., 2008). Além disto, medidas de carga viral do HPV e a integração viral ao genoma da célula hospedeira têm se mostrado como importantes para a progressão (Rosa et al., 2009; Schlecht et al., 2003).

Estudos têm indicado que a alta carga viral é importante fator de risco para neoplasia do colo de útero (Rosa et al., 2009; Schlecht et al., 2003), contudo lesões severas também podem estar associadas a cargas virais baixas (Gravitt et al., 2003). A redução no número de cópias virais poderia ser explicada pela interrupção dos genes virais E1/E2 por ocasião da integração do genoma viral no DNA celular (Wang et al., 2003).

A freqüência da integração viral parece aumentar com o grau de severidade da doença, correlacionando-se com a progressão ao câncer cervical (Wang et al., 2003). A importância biológica da integração ainda é motivo de discussão e a maioria dos estudos indica que as formas epissomais e integradas freqüentemente coexistem e podem ser encontradas não só em lesões de alto grau e carcinomas invasores (Wang et al., 2003; Peitsaro et al., 2002).

É possível que uma alta carga viral aumente a probabilidade de integração dentro de sítios cromossomiais favoravelmente selecionados para adquirir vantagem de crescimento. A integração, ao levar a expressão desregulada e aumentada dos oncogenes virais, favorece a seleção de clones de células com expressão gênica otimizada. Portanto, essa mistura de formas epissomais e integradas pode levar a suposição de que existam clones de células em estágios de progressão distintos.

Dessa forma, as células que ainda apresentam o genoma viral na forma episomal estariam em um estágio do processo de transformação anterior às células que já apresentam o genoma do HPV integrado. De fato, lesões escamosas pré-malignas e malignas contêm um grande número de partículas virais episomais associadas a seqüências integradas de DNA de HPV (Peitsaro et al., 2002).

1.3 Estrutura do genoma do Papilomavírus humano

Os Papilomavírus humano pertencem à família *Papillomaviridae*, gênero Papilomavírus. São vírus não envelopados de simetria icosaédrica, com 72 capsômeros e um genoma de DNA de fita circular, com cerca de 8.000 pares de bases (Muñoz et al., 2006). O genoma do HPV é constituído por aproximadamente oito regiões de leitura aberta (*open reading frames-ORF*), composta por pelo menos seis genes que se expressam precocemente e dois genes que se expressam tardiamente, sendo denominados respectivamente, genes E (*Early*) e genes L (*Late*). A região E é formada pelos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7. Dentre esses, E1 tem relação com a replicação viral, E2 com a transcrição e replicação, E4 com a maturação viral e alteração da matriz intracelular, E5 correlaciona-se com a proliferação celular, e E6 e E7 são os genes envolvidos na transformação celular e carcinogênese.

A região L é formada pelos genes L1 e L2, que codificam as proteínas do capsídio viral. Somando-se a isso, o genoma possui uma região reguladora LCR (*Long Control Region*) ou URR (*Upstream Regulatory Region*), localizada entre L1 e E6. Nessa região, existem seqüências estimuladoras e repressoras da transcrição viral, além da origem de replicação (Woodman et al., 2007) (Figura 1).

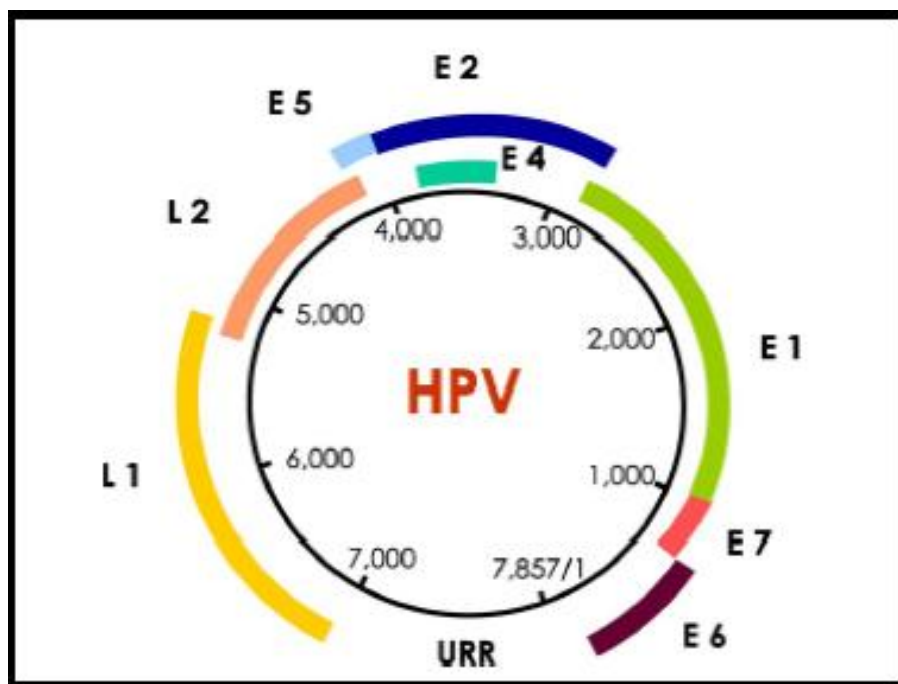


Figura 1- Representação esquemática do genoma do HPV.
 Fonte: Muñoz et al. (2006).

As oncoproteínas E6 e E7 são responsáveis pela indução, bem como, a manifestação da transformação fenotípica das células, particularmente pela inativação do controle do ciclo celular e mecanismos de apoptose. Ambas as proteínas, E6 e E7, podem favorecer a multiplicação das células alvo. O produto do gene E6 inativa o produto do gene p53 supressor de tumor, via proteína celular E6-AP e da mesma maneira, o produto do gene E7, inibe o produto do gene do retinoblastoma (pRb) (Snijders et al., 2006).

A oncoproteína E6 está ainda relacionada à ativação da telomerase através da expressão da subunidade catalítica da transcriptase reversa de telomerase humana (hTERT). A hTERT é um componente da atividade da telomerase, expressa apenas em pequeno número de células normais, como as células de reserva. A ativação da telomerase é comumente observada em cânceres humanos junto com a

inativação da p53 e do pRB. Para imortalização das células com HPV, E7 inativa o pRB e E6 induz a expressão da hTERT e a ativação da telomerase (Yugawa & Kiyono, 2009).

As oncoproteínas E7 possuem regiões conservadas em sua porção amino terminal, denominadas CR1 e CR2. CR1 é conhecida por seu papel importante na transformação celular provocada por E7. Recentemente, verificou-se que E7 interage com a proteína RB de 600 kDa, a p600, cuja função é diminuir a sinalização mediada por integrina, levando a sensibilização das células à apoptose induzida pelo desprendimento celular. E7 desregula a proteína p600, inibindo indiretamente a apoptose (Yugawa & Kiyono, 2009). E7 interage com fator associado p300 (P/CAF). P/CAF é um coativador transcricional, encontrado na proteína RB acetilada, condição necessária para diferenciação celular. P/CAF ao interagir com E7 tem sua atividade de acetiltransferase reduzida, levando a supressão da diferenciação dos queratinócitos e fortalecimento do crescimento celular (Yugawa & Kiyono, 2009).

1.4 Classificação dos HPVs

Mais de 200 tipos virais de HPV já foram identificados, cerca de 40 destes infectam o trato genital feminino (García – Espinosa et al., 2009; Hoory et al., 2008). Os tipos de HPV são divididos em subgrupos que infectam a mucosa e os vírus individuais são designados de alto e baixo risco oncogênico, de acordo com a propensão das células infectadas à progressão maligna (de Villiers et al., 2004). Os tipos de HPV considerados de baixo risco oncogênico, freqüentemente associados às NIC de baixo grau e aos condilomas acuminados, são os tipos 6, 11, 40, 42, 43, 54, 61, 70, 72, 81. Aqueles considerados de alto risco oncogênico, por estarem

freqüentemente associados às NIC de alto grau e as neoplasias invasoras são representados pelos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82 (Muñoz et al. 2003).

Os vírus HPV são ainda classificados de acordo com seu nicho biológico, potencial oncogênico e classificação filogenética (figura 2). De acordo com os critérios estabelecidos pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV), as diversas espécies de HPV que infectam o trato genital feminino são classificadas filogeneticamente no gênero *Alphapapillomavirus*. Essa classificação baseia-se na diversidade genômica da sequência completa do gene L1, que é muito conservada entre os diferentes tipos de HPV. Existem 15 espécies diferentes, divididas entre baixo e alto risco oncogênico (de Villiers et al., 2004) (Quadro 1).

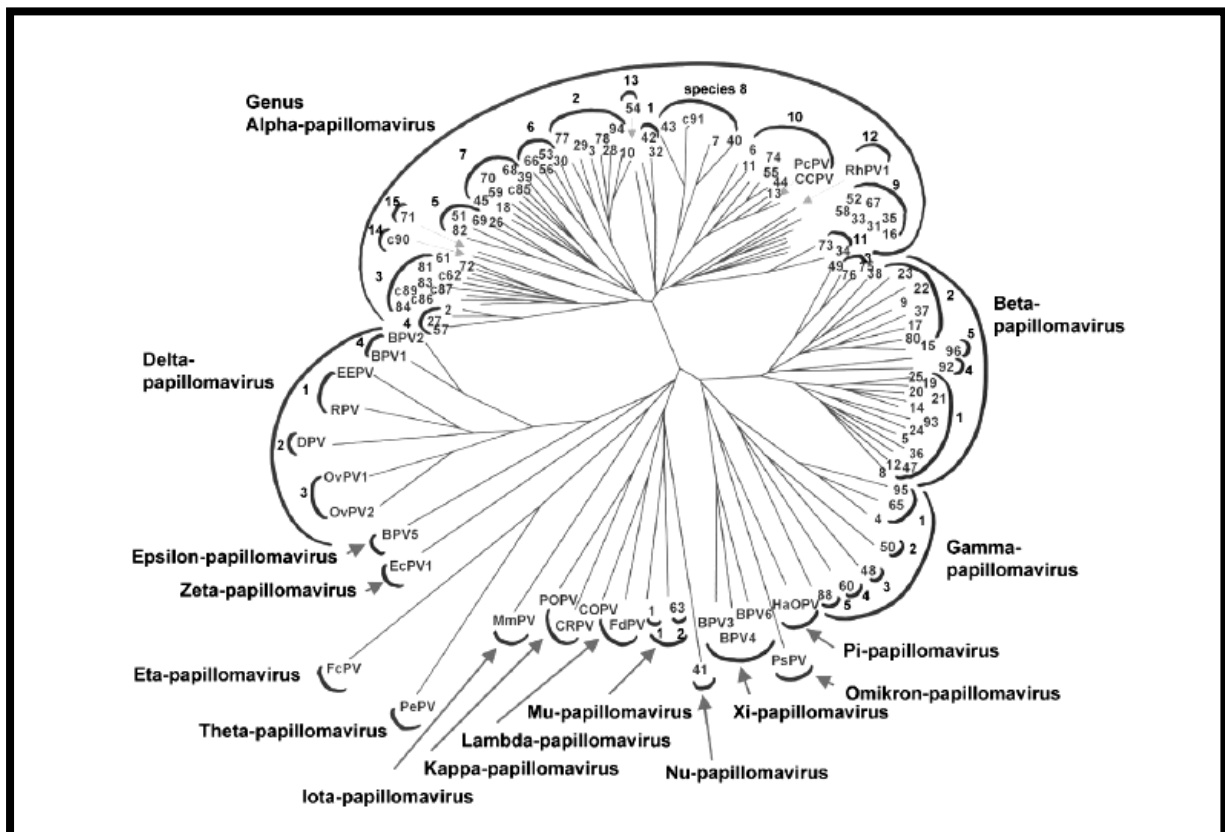


Figura 2- Árvore filogenética contendo 118 tipos de papilomavírus com base no gene da região L1. O semicírculo externo representa o gênero e o semicírculo interno refere-se à espécie do papilomavírus. Fonte: de Villiers et al., 2004.

Gênero Alphapapillomavirus	Espécie	Tipos de HPV
Alto risco oncogênico	11	34, 73
	9	16, 31, 33, 35, 52, 58, 67
	7	18, 56, 66, 39, 45, 59, 68, 70
	5	26, 51
Baixo risco oncogênico	1	32, 42
	2	10, 3, 28, 29, 78, 94
	3	61, 72, 81, 83, 84, *candHPV 62, candHPV 86, candHPV 87, candHPV 89
	4	2, 27 e 57
	6	53, 69, 82, 30
	8	7, 40, 43
	10	6, 11, 13, 44, 74
	12	Rh PV1
	13	54
	14	*CandHPV90
	15	71

*Cand: candidato a tipo

Quadro1- Classificação filogenética das espécies de HPV do gênero *Alphapapillomavirus*. Fonte: de Villiers et al., 2004 modificado.

1.5 Diagnóstico da infecção pelo HPV

Citopatologia

A citologia é o método de rastreamento do câncer cervical e suas lesões precursoras. A citologia não é o método mais adequado para detecção de infecções pelo HPV, embora haja forte correlação entre as anormalidades detectadas pelo exame citológico e a detecção do HPV (Cavalcanti & Carestiato, 2006). Cerca de 11% das mulheres com citologia normal apresentam DNA de HPV detectável. Esta proporção atinge 73% entre aquelas cujos exames citológicos mostram alguma alteração (Derchain et al., 2005).

O diagnóstico morfológico da infecção viral está na dependência do tipo de infecção determinada pelo vírus. Distinguem-se dois padrões de infecção por HPV, a infecção produtiva e a infecção transformante. A expressão descontrolada das oncoproteínas virais em células proliferativas é considerada como o fenômeno que distingue o processo da transformação celular de uma infecção viral produtiva (Wallin et al., 1999).

Na infecção produtiva, principalmente caracterizada como NIC 1, a replicação viral e a produção de vírions são fortemente acopladas ao programa de diferenciação do epitélio, conseqüentemente as anormalidades serão observadas em células maduras. As alterações são caracterizadas citologicamente como multinucleação, hipercromasia, contorno irregular da membrana nuclear, halos perinucleares e principalmente, o efeito citopático do HPV, os coilócitos (Wright, 2006).

Nas infecções transformantes, geralmente caracterizadas como NIC 2 e NIC 3, há considerável aumento na expressão das proteínas E6 e E7, resultando em instabilidade genética (Snijders et al., 2006). Citologicamente os coilócitos são ausentes ou menos proeminentes nas NIC de alto grau, sendo as anormalidades caracterizadas por células imaturas, apresentando hipercromatismo, perda da polaridade e aumento da relação núcleo citoplasmática (Wright, 2006).

Histopatologia

A infecção pelo HPV provoca transformação no epitélio celular em diversos graus. O efeito citopático clássico da infecção viral é a coilocitose, observada principalmente nas camadas superiores do epitélio, classificadas como NIC1. Ainda são encontradas outras alterações como hiperplasia ou acantose, hipercromatismo e disceratose (Wright, 2006).

Nas NIC 2 e NIC 3 as alterações se estendem ao terço superior do epitélio cervical (Crum et al., 1997). A coilocitose é menos proeminente, são encontradas células imaturas apresentando além da hiperplasia, disceratose e hipercromatismo, também é observado o apinhamento nuclear, pleomorfismo e figuras mitóticas nos casos de lesões mais severas (Wright, 2006).

Diagnóstico sorológico - ELISA

O teste sorológico ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), tem como finalidade a detecção de anticorpos específicos para a região maior do capsídeo do HPV. Como a infecção pelo HPV é seguida por resposta imune humoral contra proteínas do capsídeo do vírus, os anticorpos permanecem detectáveis por muitos

anos, não sendo capazes de distinguir infecções passadas de recentes (Pagliusi et a., 2006).

O diagnóstico sorológico das VLPs correlaciona bem com a presença do DNA do HPV em amostras cervicais. Dessa forma a sorologia com base nas VLPs tem sido usada como um marcador de exposição acumulativa ao HPV e de comportamento sexual (Pagliusi et a., 2006).

Este teste poderia ter maior aplicabilidade na determinação da exposição do HPV, o que poderia triar a população para vacinação; na pesquisa de relatos de resposta imune e em estudos epidemiológicos, como guia na idade para vacinação e também na avaliação do impacto pós vacinação (Pagliusi et a., 2006). Entretanto, a sensibilidade relativamente baixa do ELISA e a variabilidade do intervalo entre a infecção e a soro-conversão sugerem que a avaliação da resposta imune não é útil para o diagnóstico clínico da infecção (Staley, 2001).

Diagnósticos moleculares

O desenvolvimento de técnicas com alta sensibilidade para detecção do DNA revolucionaram o diagnóstico da infecção por HPV, permitindo a investigação de vários aspectos relacionados à infecção pelo HPV (Molijn et al., 2005; Castle et al., 2004).

Hibridização in situ

É uma técnica baseada na detecção de pequenos segmentos de DNA ou RNA em cortes de tecido ou preparados citológicos, utilizando uma seqüência

complementar de ácidos nucleicos com sondas marcadas. Sob condições apropriadas, ocorre a hibridização (através do estabelecimento de pontes de hidrogênio) da sonda com a seqüência-alvo do DNA viral, que pode ser visualizada através de marcadores fluorescentes ou radioativos ligados às sondas, permitindo a detecção e localização de seqüências de ácidos nucleicos do HPV em material citológico e histológico (Do Carmo & Fiorini, 2007).

A hibridização *in situ* possui sensibilidade de 70% e especificidade de 63% (Do Carmo & Fiorini, 2007). A hibridização *in situ* com sondas marcadas com fluorescência, FISH (Fluorescence In Situ Hybridization), é o método de hibridização *in situ* mais utilizado atualmente, por não utilizar marcação radioativa com sensibilidade de 92,5% e especificidade de 72,7% (Oliveira et al., 2008).

Captura Híbrida II (CH2)

O sistema de captura híbrida II baseia-se em uma reação de hibridização molecular que utiliza sondas não radioativas, com amplificação da detecção de híbridos por quimioluminescência, utilizando amostra líquida. Permite a detecção por grupos de risco, baseada na pesquisa de 18 sondas dos HPVs mais freqüentes. O grupo A possui sondas para os HPVs de baixo risco (6, 11, 42, 43 e 44), e o grupo B, sondas para os HPVs de risco intermediário ou alto (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68). A sensibilidade da CH2 é de 98,1% e a especificidade 97,6% (Stiliman et al., 2009).

Este ensaio se tornou o padrão em muitos países, é amplamente utilizado em estudos clínicos. No entanto, HC2 tem algumas limitações, uma vez que embora

possa distinguir entre os grupos de alto baixo risco oncogênico, não permite identificação de tipos específicos de HPV (Burd et al., 2003).

Amplificação do DNA-HPV

Os testes para detecção do HPV usando sondas de ácidos nucleicos são comercialmente disponíveis desde a década de 1980. A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) é o método de amplificação do DNA-HPV mais utilizado. A técnica amplifica uma seqüência específica do DNA, com a ajuda de uma enzima termoestável (Taq-polimerase) (Molijn et al., 2005). Distinguem-se dois tipos de testes de amplificação do DNA-HPV, as chamadas PCR tipo específicas e as PCR de consenso.

PCR tipo específica

A utilização de *primers* tipo específicos amplifica apenas um tipo de HPV, utilizando como alvo uma seqüência específica, em geral dos genes E6 e E7. Para detectar o DNA do HPV em amostras simples devem ser realizadas múltiplas reações de PCR tipo específicas separadamente. É uma técnica trabalhosa, cara e deve ser validada para cada *primer* de PCR tipo específica (Molijn et al., 2005).

PCR de consenso

Existem quatro tipos de *primers* de consenso que amplificam uma região dentro do gene L1 do genoma do HPV, que é comum a 43 tipos de HPV: MY09/11, PGMY09/11 (do sistema Amplicor MWP) GP5+/GP6+, e SPF1/2 (do sistema Innogenetics), que amplificam fragmentos de 450 pb, 170 pb, 100 pb e 65 pb,

respectivamente. A revelação das amostras amplificadas (*amplicons*) pode ser feita através de diversas técnicas, como a análise da seqüência do polimorfismo do fragmento de restrição, hibridização com sondas tipo-específicas, eletroforese em gel e hibridização reversa (Moljin et al., 2005; Gravitt et al., 2000).

Depuydt et al., (2007) comparou as técnicas PCR de consenso com o uso dos *primers* MY09/11 e a técnica de PCR tipo específica para HPVs de alto risco oncogênico em pacientes com diagnóstico histológico de NIC 2 ou lesão mais grave. A sensibilidade da PCR tipo específica foi determinada através de plasmídeos contendo o genoma do HPV juntamente com 30 ng de DNA humano feminino para simular o ambiente do complexo ácido nucléico quando for amplificado. Uma série de diluições foram feitas a partir de 10^6 para 1 cópia de HPV e curvas padrão para cada um dos 16 tipos de HPVs testados com PCR tipo específica. A especificidade foi calculada através da capacidade de discriminar os plasmídeos para cada tipo de HPV. Os tipos de HPVs 16, 18, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 67, 68 foram testados com PCR de consenso MY09/11 em combinação com a PCR tipo específica com primers e sondas para detecção do E7 HPV16, E718, E6 31, E6 33, E6 35, E7 39, E7 45, E7 51, E7 52, E6 53, E7 56, E6 58, E7 59, E6 66, L1 67, E7 68 e β -Globina. Foi observada uma sensibilidade de 87,9% para PCR de consenso e 98,3% na PCR tipo específica e uma especificidade de 38,7% para PCR de consenso e 76,14% para PCR tipo específica.

PCR por comprimento do fragmento de restrição (PCR-RFLP)

Após a amplificação, a composição de uma seqüência do produto de PCR pode ser investigada por enzimas de restrição. A digestão dos produtos de PCR com

endonucleases de restrição geram fragmentos, que podem ser visualizados por gel de eletroforese, resultando em um determinado padrão de bandagem. O método depende da disponibilidade de enzimas de restrição capazes de detectar mutações específicas e embora, simples é trabalhoso. A detecção de múltiplos genótipos de HPV, presente em diferentes quantidades em uma amostra clínica através de PCR-RFLP é usualmente complexa (Grce et al., 2000).

Hibridização reversa

A tecnologia de hibridização reversa utiliza uma tira de membrana contendo várias sondas imobilizadas como linhas paralelas, chamadas line probe assay (LIPA); ensaio line blot (LBA) ou da matriz linear (AL) (Gravitt et al., 2000; Molijn et al., 2005). Este método fornece uma ferramenta atraente para hibridação simultânea de um produto da PCR com múltiplas sondas de oligonucleotídeos, e compreende a imobilização de sondas em uma fase sólida e do produto da PCR em fase líquida. O produto da PCR é gerado, usando *primers* biotinilados. Este é desnaturado em condições alcalinas e adicionado em solução tampão de hibridização (figura 2). Após a hibridação, o material é lavado, e os híbridos podem ser detectados pela adição de um conjugado de estreptavidina e um substrato, gerando cor na linha de sonda, que pode ser visualmente interpretada (figura 3). Este método permite a detecção de múltiplos tipos de HPV com alta sensibilidade em uma única etapa e requer somente uma quantidade limitada do produto da PCR (Molijn et al., 2005; Gravitt et al., 2000).

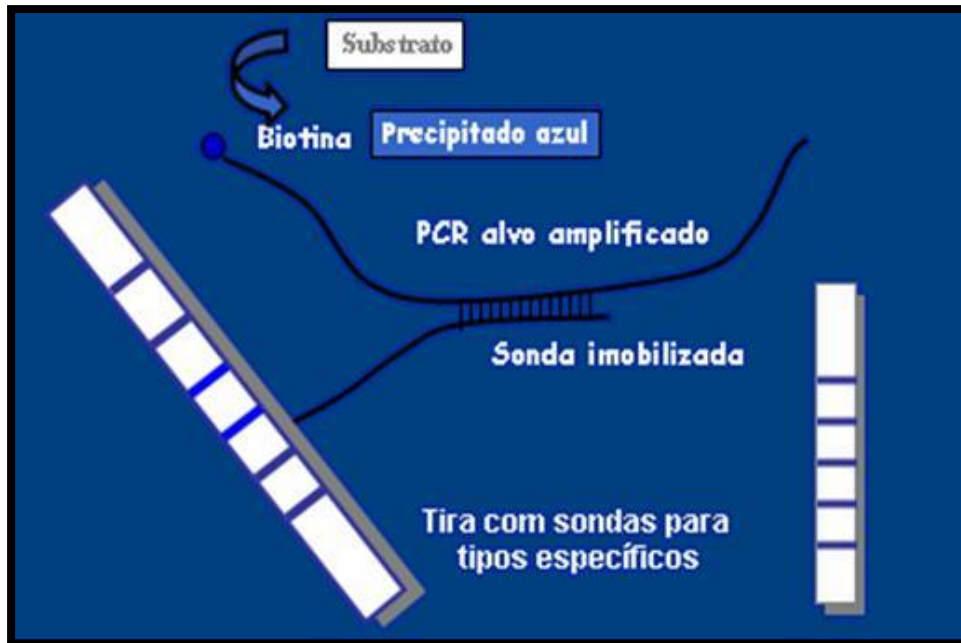


Figura 3 - Técnica de hibridização reversa em pontos.
Fonte: Roche Molecular Systems, Inc.

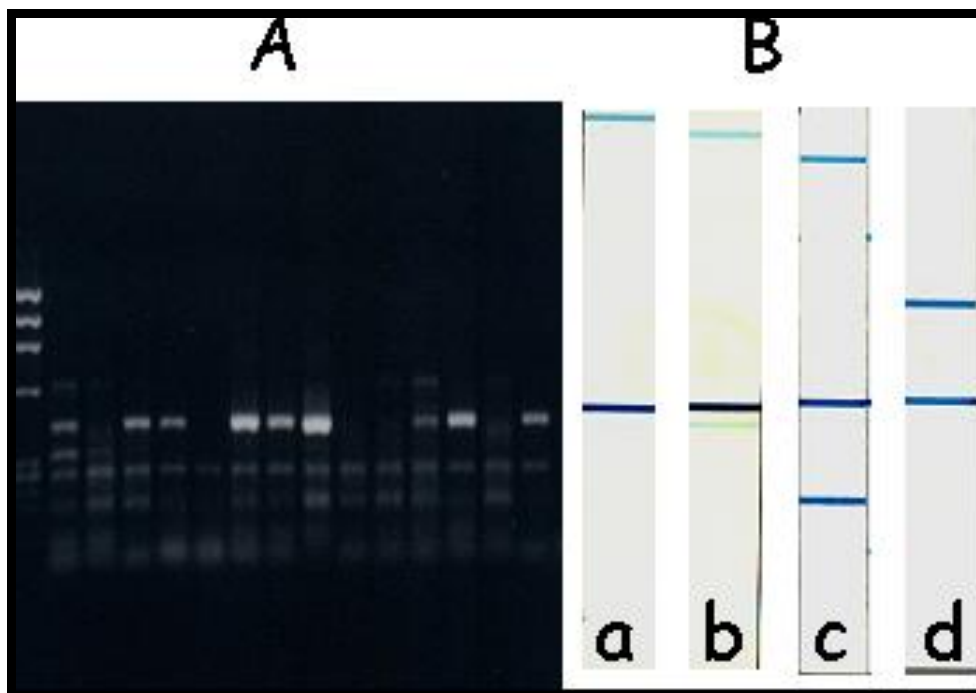


Figura 4 - A: Gel de agarose casos positivos para HPV utilizando os primers de consenso biotinilados PGMY09/PGMY11 que amplificam um fragmento de 450 pares de base da região L1. B: Hibridização reversa em pontos. Sondas para tipos específicos de HPV imobilizadas em tiras de nylon. As tiras mostram marcação de globina e positividade para tipos específicos de HPV. Tira "a" mostra positividade para o tipo HPV 16, "b" ao HPV 18, "c" ao HPV31 e HPV 53 e "d" ao HPV 58. Fonte: Roche Molecular Systems, Inc.

PCR em tempo real

A “real-time” PCR ou em tempo real, utiliza um tipo específico de *primers* podendo ser combinados com sondas fluorescentes para detecção do HPV–DNA. Isso possibilita a eliminação da etapa trabalhosa pós-amplificação (preparo do gel para eletroforese), convencionalmente necessária para visualização do produto amplificado. As vantagens da PCR em tempo real, em relação a PCR convencional são: velocidade, reprodutibilidade e capacidade de quantificação, tornando esta técnica mais sensível, específica e reprodutível. Entretanto, possui algumas desvantagens como: não é ideal para multiplex de vários *primers* específicos dentro de um mesmo tipo de reação, sua utilização requer alta habilidade técnica e suporte e alto custo do equipamento (Molijn et al., 2005).

1.6 Prevalência de tipos específicos de HPV em mulheres com ou sem lesões cervicais

O HPV 16 é o tipo mais comum em mulheres com ou sem lesão cervical (Bosh et al., 2008). Os tipos de HPV envolvidos nas NIC de alto grau são os HPVs 16, 18, 31, 51, 53, 56, 52, 66 e 58. Os mais frequentemente encontrados nas NIC de baixo grau são os HPVs 16, 31, 58, 18, 33, 52, 35, 51, 56, 45, 39, 66 e 6 (Clifford et al., 2006). Rousseau et al., 2001 em um estudo realizado em São Paulo identificaram os tipos 16, 31, 51, 52, 53, 58 e 84 como os mais prevalentes. Em mulheres com anormalidades citológicas do Rio Grande do Norte, a infecção pelo HPV esteve presente em 40.2% das NIC de baixo grau e em 67,2% das mulheres

que apresentaram NIC de alto grau. O tipo mais prevalente foi o HPV 16, seguido do HPV 58 e 45 (Fernandes et al., 2009).

Em adolescentes na periferia da cidade de Goiânia, Goiás, o HPV 16 foi o mais prevalente seguido dos tipos 51, 31, 52. O HPV 18 foi o quinto mais prevalente. Nas infecções múltiplas predominaram os tipos 16, 51, 31, 18 e 53. As associações mais frequentes do HPV16 em infecções por múltiplos tipos foram com os tipos 51, 31, 52, 53, 6, 18, 39, e 58. Neste mesmo estudo, foram identificados 30 tipos de HPVs diferentes, agrupados nas espécies 5, 6, 7, 9 e 11, distribuídas segundo o grau de anormalidades citológicas observadas (Alves 2006).

Em relação às mulheres com citologia normal, segundo um estudo realizado no Nordeste do Brasil, o HPV 16 foi o mais prevalente, seguido do tipo 58 (Fernandes et al., 2009).

Um estudo realizado em Campinas, São Paulo indicou uma prevalência total de HPV de 99%, incluindo 35,3% de infecções simples e 64,7% de infecções múltiplas em mulheres diagnosticadas com NIC 2 ou NIC 3. Os tipos mais prevalentes em infecções simples ou múltiplas foram os HPVs 16, 58, 33, 52, 31, 51 e 18. (Pitta et al., 2009).

Ainda considerando os diagnósticos neoplásicos, oito tipos mais comuns de HPV incluindo os tipos 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, e 35 são responsáveis por cerca de 90% de todos os cânceres cervicais no mundo. Os HPVs 16 e 18 são encontrados em 70% dos carcinomas escamosos e em 86% dos adenocarcinomas cervicais (Muñoz et al., 2006). No Brasil, a prevalência dos tipos de HPV em mulheres com NIC de alto grau e cânceres cervicais não é uniforme, exceto para o HPV16, que é o tipo mais prevalente em todas as regiões. Na região Centro-Oeste,

nos casos diagnosticados como NIC 3 e carcinomas invasivos, o segundo tipo viral mais prevalente foi o HPV 33 e o terceiro mais prevalente, o HPV 18. Nas regiões Norte, Sudeste e Sul o HPV 18 foi o segundo mais prevalente, enquanto no Nordeste o tipo 31 foi o segundo mais prevalente (Rabelo-Santos et al. 2003).

1.7 Infecções simples e infecções por múltiplos tipos de HPV

O papel das infecções múltiplas por HPV na persistência da infecção e no risco para carcinogênese é controverso, ou seja, existem estudos que demonstram aumento de risco de NIC relacionado à infecções múltiplas, enquanto outros relatam padrões de risco muito semelhantes entre infecções por múltiplos tipos e aquelas determinadas por um único tipo de HPV (Trottier et al., 2006; Herrero et al., 2005).

Infecções múltiplas podem ser comumente encontradas em estudos epidemiológicos. Bello et al., (2009) observaram que as infecções múltiplas foram mais prevalentes entre as mulheres encaminhadas com citologia anormal. A prevalência total de infecções múltiplas encontrada foi de 44,2%, presente em 63,1% das NIC 1 e em 80,8% das neoplasias de alto grau \geq NIC 2.

A probabilidade de mulheres jovens adquirirem infecções múltiplas por HPV de alto risco oncogênico é de cerca 17%. Em mulheres com idade entre 40 e 50 anos, a prevalência de infecções múltiplas por HPV de alto risco oncogênico é de 3,6%. Contudo, mulheres em faixa etária mais avançada possuem um risco maior de adquirirem NIC de alto grau. Este risco é de aproximadamente 25% em 5 anos de seguimento e de 35% após 10 anos de seguimento. Isso reflete o fenômeno da história natural da infecção pelo HPV, sugerindo que mulheres jovens possuem maior probabilidade de infecção devido ao comportamento sexual, mas muitas

destas infecções são transitórias. Em mulheres em faixa etária mais avançada, há maior probabilidade de NIC ou lesões mais graves, através da progressão (Kjaer et al., 2006).

Herrero et al., (2000) encontraram uma prevalência de 11% de infecções por HPV em mulheres sem anormalidades citológicas, incluindo 4,3% de infecções múltiplas. Os tipos mais comuns encontrados foram o HPV 16 e o HPV 18. É possível que as infecções persistentes por HPV 16 ou HPV 18 possibilitem maior suscetibilidade das mulheres a adquirirem infecções múltiplas através da co-infecção com outros tipos de HPV (Rousseau et al., 2001). Ho et al (1998), observaram que as infecções múltiplas possuem maior persistência quando comparado a infecções simples (OR 4.1%; IC 95% 2.7-6.3), (OR 1.5%; IC 95% 1.1-2.2), respectivamente. Estudos têm demonstrado que mulheres infectadas por múltiplos tipos de HPV são mais prováveis de possuírem NIC de grau 1 ou lesões mais graves (Rousseau et al., 2003; Schiffman et al., 2003). van der Graaf et al., (2002) observaram que as infecções múltiplas por HPVs de alto risco oncogênico, principalmente na presença do HPV 16 possuíram maior risco de progressão para as NIC de alto grau e câncer cervical quando comparadas com as infecções simples de alto risco oncogênico.

Paradoxalmente, Liaw et al (2001) indicaram que o HPV 16 possui maior persistência e aumenta as chances de co-infecção por outros tipos de HPV, no entanto, a presença de múltiplos tipos de HPV não interfere na progressão das lesões quando o HPV 16 está presente. Outros estudos também têm mostrado que o risco de NIC ou câncer invasivo em mulheres com infecções simples não difere do risco relacionado às infecções múltiplas (Trottier et al., 2006; Chaturverdi et al., 2005).

Trottier et al., (2006) indicaram que a presença de infecções múltiplas por HPV que não incluíram o HPV 16 foi associada a um alto risco para todos os graus de neoplasia e de câncer. Por outro lado, Herrero et al., (2005) estabeleceram que comparado com a infecção única pelo HPV 16, a presença de outros tipos não aumentou o risco nas lesões NIC 2 ou NIC 3 ou neoplasias mais severas, o risco aumentou apenas nas infecções por múltiplos tipos quando o HPV 16 esteve presente. A disparidade dos resultados pode provir do fato de que muitos estudos de corte transversal têm sido focados na detecção dos tipos específicos de HPV e, portanto, podem ter subestimado o efeito da exposição a diferentes tipos de HPV ao longo da vida (Trottier et al., 2006).

1.8 Vacinas

A descoberta de que a proteína L1 é capaz de organizar-se em partículas de estrutura icosaédrica, semelhantes ao capsídeo viral, VLPs (*virus-like particles*), mas sem o DNA do vírus, possibilitou o avanço do conhecimento sobre a imunogênese do HPV e o desenvolvimento das vacinas profiláticas (Rosa et al., 2009).

Duas vacinas profiláticas contra o HPV foram recentemente licenciadas em muitos países, inclusive no Brasil. A chamada Cervarix da GlaxoSmithKline protege contra HPV-16 e 18 e a Gardasil da Merck Sharp & Dohme, protege contra os HPVs 16, 18, 6 e 11. Ambas contêm a proteína L1 do capsídeo viral, produzida através de tecnologia recombinante para a obtenção de partículas análogas às virais (VLPs) dos dois vírus mais comuns nos cânceres cervicais: os HPV16 e HPV18. A vacina, Gardasil também contém VLPs de tipos não-oncogênicos HPV- 6 e HPV-11, que estão implicados em 75-90% das verrugas genitais (Einstein et al.,2009).

A quantidade de VLPs, assim como o sistema adjuvante, difere em cada vacina. Uma considerável quantidade de trabalhos multicêntricos já foi realizada, demonstrando evidências convincentes favoráveis à vacinação anti-HPV. Para as duas vacinas, a proteção contra os tipos oncogênicos HPV 16 e 18 está bem estabelecida. Estudos randomizados de ensaios clínicos, têm mostrado eficácia em 6.4 anos pós vacinação para a Cervarix e em pelo menos 5 anos para Gardasil (Einstein et al., 2009). Embora seguras, imunogênicas e efetivas na prevenção de infecções e lesões precursoras do câncer cervical relacionadas aos HPVs 16 e 18 capazes de induzir proteção cruzada para alguns outros tipos de HPV como o HPV 31, 33 e 45, mas não são capazes de prevenir totalmente o câncer cervical.

A vacinação é recomendada para jovens entre 11 a 12 anos de idade, é aceitável em mulheres até 26 anos, embora sua eficácia diminua com o aumento da idade, sendo necessário o uso de três doses para a imunização (Massad et al., 2009).

Apesar da alta prevalência de infecções múltiplas pelo HPV, a vacinação antes da exposição ao HPV irá reduzir a prevalência das lesões precursoras na população feminina com uma taxa de até 70%. Estudos longitudinais sugerem que a eliminação dos HPVs 16 e 18 resultará em redução de 17% de todas as anormalidades citológicas na população mundial, incluindo 8% das atipias intra-epiteliais escamosas de significado indeterminado, 23% das NIC de baixo grau, 45% das NIC de alto grau e 72% dos cânceres invasores (Massad et al., 2009; Schiffman et al., 2007).

A eficácia da proteção cruzada da vacina quadrivalente foi investigada em um estudo de caso-controle para 14 outros tipos de HPVs. Observou-se diminuição da

incidência, principalmente do HPV 31 e outros tipos como os HPVs 33, 45, 52 e 58. Considerando as espécies filogenéticas, a proteção cruzada foi mais evidente nos HPVs da espécie A9 e para os HPVs da espécie A7 houve eficácia para os HPVs 39, 45 e 59 em relação à eficácia da proteção cruzada em pacientes com NIC 1, NIC 2, NIC 3 e Adenocarcinomas. Neste mesmo estudo, a diminuição da incidência foi significativamente maior em pacientes com NIC 2, NIC 3 e Adenocarcinomas para os tipos de HPV 31 e 45, e a proteção cruzada para os outros tipos de HPVs foi semelhante aos já relatados (Brow et al., 2009). A vacina bivalente da GaloxoSmithKline também apresentou proteção cruzada para os HPVs 31, 33 e 45 (Paavonen et al., 2009).

É possível que na próxima década uma segunda geração de vacinas profiláticas contra o HPV esteja disponível, incluindo outros tipos de HPVs oncogênicos (Brown et al., 2009).

1.9 Justificativa

Existem diferenças entre a distribuição dos tipos de HPV em mulheres de diferentes países. Há variação entre a distribuição de tipos específicos em diferentes regiões do Brasil. Poucos estudos de prevalência de tipos específicos têm sido conduzidos na Região Centro-Oeste. Até o momento, uma série de mulheres portadoras de neoplasias cervicais encaminhadas por exame citopatológico alterado e histologicamente diagnosticadas ainda não tinham sido alvo de um estudo. É fato que um melhor conhecimento dos padrões da infecção simples ou por múltiplos tipos de HPV e sua relação com a gravidade da lesão cervical poderá significar um avanço no entendimento da história natural destas condições. Assim, é de extrema

importância realizar estudos regionais não só sobre a prevalência da infecção pelo HPV, mas também sobre a distribuição de tipos, com o intuito de avaliar os potenciais benefícios da vacina.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral:

Avaliar o efeito das infecções simples ou por múltiplos tipos de HPV, considerando também os grupos filogenéticos, sobre a prevalência e a gravidade da neoplasia cervical em mulheres da região Centro-Oeste.

2.2 Objetivos específicos:

1. Identificar os tipos de HPV em infecções simples ou por múltiplos tipos, de acordo com o diagnóstico histológico;
2. Avaliar a associação entre tipos de HPV de alto risco e os diagnósticos neoplásicos de alto grau (\geq NIC 2);
3. Avaliar a associação entre infecções simples por HPV de alto risco e os diagnósticos neoplásicos de alto grau (\geq NIC 2);
4. Avaliar a associação entre infecções múltiplas por HPV de alto risco, com ou sem a presença do HPV 16, e os diagnósticos neoplásicos de alto grau (\geq NIC 2);
5. Avaliar a associação entre espécies filogenéticas de HPV de alto risco e os diagnósticos neoplásicos de alto grau (\geq NIC 2);

3. Publicações

Artigo 1:

Association between HPV types and cervical neoplasias

Andrea Alves Ribeiro, Luísa Lina Villa, Rosane Ribeiro Figueiredo Alves, Maria Cecília Costa, Luiz Carlos Zeferino, Sophie Françoise Mauricette Derchain, Megmar Aparecida dos Santos Carneiro, Silvia Helena Rabelo dos Santos.

Artigo a ser submetido ao *International Journal of Gynecological Pathology*

**Association Between HPV Types and Species Groups and Cervical Neoplasia
from a High Risk area for Cervical Cancer, Goiânia, Brazil**

Andrea Alves Ribeiro, B.Sc., Rosane Ribeiro Figueiredo Alves, Ph.D., Maria Cecília Costa, B.Sc., Luísa Lina Villa, Ph.D., Luiz Carlos Zeferino, Ph.D., Sophie Françoise Mauricette Derchain Ph.D., Megmar Aparecida dos Santos Carneiro, Ph.D., Sílvia Helena Rabelo-Santos, Ph.D.

From the Institute of Tropical Pathology and Public Health (A.A.R., M.A.S.C),
Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

From School of Medicine, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil and Santa Casa Hospital, Catholic University of Goiás, Brazil (R.R.F.A.);

From Ludwig Institute of Cancer Research, São Paulo, SP, Brazil (M.C.C., L.L.V.);

From Department of Obstetrics and Gynecology, University of Campinas (UNICAMP), São Paulo, SP, Brazil (L.C.Z., S.F.M.D.);

From School of Pharmacy and Institute of Tropical Pathology and Public Health (S.H.R.S.), Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil.

Address correspondence and reprints request to:

Sílvia Helena Rabelo dos Santos Ph.D., Avenida Universitária c/ 1º Avenida, Setor Universitário CEP: 74605-220, Goiânia, GO, Brazil. Telephone (fax): 55-6232096044.

E-mail: silvia.rabelo@pesquisador.cnpq.br

Financial support: PPSUS/SECTEC/CNPq

Summary

This study was designed to evaluate the effect of single or multiple HPV infections and phylogenetic groups on the prevalence and severity of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in women undergoing colposcopy following an abnormal cervical smear. Colposcopy was performed in 198 cases and biopsy was carried out in 193 patients. All specimens were tested for 27 HPV genotypes using Roche's polymerase chain reaction reverse line blot assay. The overall prevalence of HPV infection in women with an abnormal cervical smear was 86% (171/198). The prevalence of HPV 16 in high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2/3) was 52% (40/76), being detected in 88.8% of cases (8/9) of invasive carcinoma. The prevalence of HPV types 31 and 35 in high-grade CIN was, respectively, 10.5% (8/76) and 6.6% (5/76). Single or multiple-type infections involving HPV 16 were significantly associated with a diagnosis of high-grade neoplasia (\geq CIN2) (OR 6.49; 95%CI: 1.88 - 23.44 and OR 3.65; 95%CI: 1.13 - 12.15) even after adjustment for HPV-DNA. A statistically significant association was also found between HPV 16 and the other HPV types belonging to species Alpha 9 and a diagnosis of high-grade neoplasia (OR 7.62; 95% CI 1.28 – 51.58); however, no association was found between HPV 16 and the other HPV types belonging to species Alpha 7. HPV 16 is the most important predictor of high-grade cervical neoplasia. Multiple-type infections are predictors of high-grade cervical neoplasia when type 16 is present.

Key words: Human papillomavirus - Diagnosis of Neoplasia - Cervical Intraepithelial Neoplasia - Single infection - Multiple-type infection.

INTRODUCTION

Infection by a group of 18 oncogenic HPV types is considered a prerequisite for cervical cancer and its precursor, cervical intraepithelial neoplasia (CIN) (1). The risk of cervical neoplasia associated with infection by individual HPV types has been examined to some extent and there are indications that the specific types lead to different risks for the persistence and progression. Worldwide, HPV 16 is in women with cervical cancer or CIN (2-5).

HPV 16 and 18 represent paradigms for high-risk HPV; however, these two types are not closely related to each other. They are part of two different phylogenetic groups, one referred to as HPV species Alpha 9 and formed by HPV types 16, 31, 33, 35, 52, 58 and 67, and the other referred to as species Alpha 7 and formed by HPV types 18, 39, 45, 56, 59, 66, 68 and 70. The group 6 is formed by HPV types 53, 30, 69 and 82, while group 5 consists of HPV types 26 and 51 (6).

Coinfection with multiple HPV types has been a common finding in many molecular studies. Some HPV types may interact or act synergistically to induce progression. However, the significance of multiple HPV infections with regards to the clinical management of cervical lesions and to predicting outcomes of HPV infection is not yet completely understood (7). Studies have associated multiple HPV infections with higher risk for development and/or progression of cervical neoplasia (7, 8), whereas others have reported risks for cervical disease that were no greater in women with multiple HPV types than in those with single infections (3, 9).

Few studies have investigated the interactions of viral genotypes or species in multiple HPV infection. In addition, little information is available on the issue of the clustering patterns of HPV groups or genotypes involved in concurrent or sequential

multiple infections; therefore, studying clustering patterns may provide further information on the possibility of existence of separate transmission patterns. In fact, DNA-based follow-up studies have suggested that a preexisting HPV infection at baseline increases the risk of acquiring both phylogenetically related and unrelated genotypes (10, 11).

Information on the importance of single or multiple-types within the context of phylogenetic groups in women with cervical neoplasia is also sparse and this approach is clinically relevant for the planning of vaccination programs and in post-vaccination monitoring. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of single or multiple HPV infections and phylogenetic groups on the prevalence and severity of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in women undergoing colposcopy following an abnormal cervical smear.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Between January 2006 and March 2009, a series of 198 women referred to a regional referral colposcopy clinic in Goiânia central area of Brazil to abnormal cervical smear were included in this study. The Institutional Review Board approved the study protocol and all participants gave their written informed consent prior to admission to the study.

Procedures

Women were considered eligible for the study if they fulfilled all the following requirements: a) age between 14 and 75 years; b) having an intact uterus (i.e. no

previous surgical procedures on the uterus or cervix); c) a history of abnormal cervical smear tests in the past year; d) were not currently undergoing treatment for genital condyloma (external or cervical); e) had abstained from sexual intercourse in the 3 days preceding consultation; and f) had no confirmed or clinically suspected immunosuppression (induced by HIV, corticosteroids, chemotherapy or any other chronic disease that could affect the immune system).

At colposcopy, a cervical sample was taken for a second conventional smear using a cervical brush, and the residual material was rinsed and stored in 1.0mL Universal Collection Medium (QIAGEN Sample & Assay Technologies) for HPV DNA testing. Biopsies were taken from any colposcopically abnormal area. Women with a suspicious image penetrating the cervical canal and those in whom colposcopy was unsatisfactory and a second cervical smear was abnormal were submitted to cervical conization. Women with invasive carcinomas were treated according to the appropriate clinical guidelines. When a woman was submitted to more than one histologic examination, the most severe diagnosis was considered.

A total of 193 biopsies were performed and analyzed according to the criteria defined by the World Health Organization and classified as normal/cervicitis, CIN 1, CIN 2, CIN 3, invasive squamous cell carcinoma or invasive adenocarcinoma. The remaining 5 women in the study tested negative at colposcopy and negative in their repeat cervical smear; therefore, the final diagnosis in these cases was negative for neoplasia and for the purposes of analysis they were classified together with the women who had a histological finding of normal/cervicitis. These 5 women were scheduled to return for follow-up visits every 3 months, and the duration of follow-up

in these cases ranged from three months to 2 years at the cut-off date for this analysis.

Sample Processing and DNA Extraction

Aliquots of 200 μ L of Universal Collection Medium were taken for polymerase chain reaction (PCR) testing and were centrifuged for 10 minutes at 13,000 x *g*. The supernatants were immediately removed and split cellular pellets stored at -80°C prior to nucleic acid extraction and HPV detection. The cellular pellets were resuspended in 200 μ L of digestion solution (1mM Tris, 200 ug of proteinase K/mL, 0.5% sodium dodecyl sulfate) and digested at 55°C for 2 hours. Digestion was followed by 5-minute incubation at 95°C to inactivate proteinase K. Nucleic acids were purified by phenol chloroform extraction followed by ethanol precipitation. After the pellet of deoxyribonucleic acid (DNA) had dried, it was dissolved in 100 μ L of Tris-ethylenediaminetetraacetic acid (TE-EDTA) solution (Tris 1 mM, EDTA 100 μ M, pH 8.2). The nucleic acids were stored at -80 °C until use.

HPV-DNA Testing

DNA was amplified using PGMY09/11 HPV-specific primers that amplify the 450-bp fragment of the L1 open reading frame of genital HPV. HPV-DNA genotyping was performed using a reverse line-blot hybridization assay which involved the hybridization of a 450-bp PCR amplicon generated by the PGMY primer set to a nylon strip containing immobilized probes (12). The strip contained 2 levels of β -globin control probes, 18 high-risk HPV probes (HR-HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51,52, 55, 56, 58, 59, 68, 73, 82, and 83) and 9 low-risk HPV probes (LR-HPV 6, 11, 40, 42, 53, 54, 57, 66, and 84). PCR reagents, probe strips and developing reagents were kindly supplied by Roche Molecular Systems Inc. (Pleasanton, CA,

USA). The 100 μ L volume of the amplification mixture contained 4mM of MgCl₂, 50mM of KCl, 7.5U of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Perkin-Elmer, Foster City, CA), 200 μ M each of dATP, dCTP, dGTP, 600 μ M of dUTP, 100 pmol of each biotinylated PGMY09/PGMY11 primer pool and 2.5 pmol each of 5' biotinylated β -globin primers, GH20 and PCO4. The following amplification profile was used: activation of AmpliTaq Gold for 9 minutes at 95°C, denaturation for 1 minute at 95°C, annealing for 1 minute at 55°C, extension at 72°C for 1 minute for a total of 40 cycles, followed by a 5-minute terminal extension step at 72°C. Amplicons were denatured in 0.4N NaOH and 40 μ L of denatured product were reacted in 3mL of hybridization buffer with a reverse line-blot containing HPV genotypes and β -globin probe at 2 concentrations immobilized on nylon strips. Positive hybridization was detected by streptavidin-horseradish peroxidase-mediated color precipitation on the membrane at the probe line. In specimens considered HPV-negative the 2 globin lines (high and low copies) appear at levels comparable to positive controls, or were repeated until the criteria for globin positivity was reached.

Histopathology

The specimens were reviewed according to the World Health Organization criteria (13) and classified as: CIN 1, CIN 2, CIN 3, invasive squamous carcinoma or invasive adenocarcinoma. All the histological analyses were performed at the same pathology laboratory and all diagnosis were made by the same pathologist, who was blinded with respect to the cytological diagnosis.

Statistical Analysis

The prevalence rates of HPV genotypes in single or multiple infections were described according to the histological findings. The associations of specific HPV

genotypes and phylogenetic groups with the final diagnosis were assessed using odds ratios with their respective 95% confidence intervals (95%CI). The reference for the calculation of OR was HPV negative cases and HPV 16 and/or HPV 18 negative cases. When HPV types other than HPV 16 or 18 are taken as a reference the results were considered as adjusted to HPV-DNA. The entire statistical analysis was carried out using the SAS software program, version 8.0.

RESULTS

The overall prevalence of HPV in women with an abnormal cervical smear was 86% (171/198), and 97% of these cases (166/171) consisted of high-risk oncogenic types. The prevalence of single infection was 48.5% (83/171) and multiple infections represented 51.5% (88/171) of all cases. Of the total population of HPV-positive women, 45% (77/171) were infected with HPV 16 either as a single or multiple-type infection. HPV 31 and HPV 35 were, respectively, the second (11.1%; n=19) and third (6.4%; n=11) most prevalent types (Table1).

The distribution of HPV genotypes and histological diagnosis is also shown in Table 1. The prevalence of HPV 16 in the women with a histological diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 1 was 32.1% (18/56). With respect to the most severe lesions, HPV 16 was present in 58.4% of cases (21/36) of CIN 2, 47.5% of cases (19/40) of CIN 3 and 88.8% of cases (8/9) of invasive carcinoma (including 5 squamous cell carcinomas and 3 adenocarcinomas). The HPV 31, either as a single or multiple infections, was detected in 14.2% of cases (8/56) of CIN 1, 8.3% of cases (3/36) of CIN 2 and in 12.5% of cases (5/40) of CIN 3. Type 35 was detected in 8.9% of cases (5/56) of CIN 1, 5.3% (2/36) of CIN 2 and in 7.5% of cases (3/40) of CIN 3.

HPV 52 was the fourth most prevalent type, while HPV 18 was the fifth most prevalent and was detected in 5.4% of cases (3/56) of CIN 1 and in 8.3% of cases (3/36) of CIN 2.

The overall positivity for HPV, including both single and multiple-type infections, was significantly associated with a diagnosis of high-grade neoplasia (\geq CIN 2) (OR 3.00; 95%CI: 1.12 - 8.29). When analyzed separately, a single infection was significantly associated with a diagnosis of neoplasia (OR 3.22; 95%CI: 1.13 - 9.48); however, no statistically significant association was found in the case of multiple-type infections (OR 2.49; 95%CI: 0.88 - 7.28). A statistically significant association was found with HPV 16 positivity as a single (OR 6.49; 95%CI: 1.88 - 23.44) or multiple-type infection (OR 4.73; 95%CI: 1.63 - 14.17). No association was found with respect to the HPV types other than HPV 16 and 18, either as a single (OR 2.47; 95%CI: 0.77- 8.17) or multiple-type infection (OR 1.71; 95%CI: 0.52 -5.76) (Table 2).

A diagnosis of high-grade neoplasia (\geq CIN2) was significantly associated with HPV 16 as a single or multiple-type infection (OR 2.34; 95%CI: 1.18 - 4.65), when HPV types other than HPV 16 or 18 are taken as a reference. No association was found for HPV 18, either as a single or multiple-type infection (OR 1.06; 95%CI: 0.17- 6.12) (Table 3).

A diagnosis of high-grade neoplasia (\geq CIN2) was significantly associated with HPV 16 and with the other HPV types belonging to species 9 (OR 7.62; 95%CI: 1.28 - 51.58) and to multiple-type infections, taking the HPV-negative cases as a reference. A borderline association was found when HPV types other than HPV 16 were considered as reference (OR 3.76; 95%CI: 0.82 - 10.50). No association was

found for HPV 16 when taken together with the other HPV types belonging to species 7 or for HPV 16 together with all the other types (Table 4).

DISCUSSION

The results of this study corroborate several others data that indicated that HPV 16 as the most important predictor of high-grade cervical neoplasia. In addition, multiple-type infections are predictors of high-grade cervical neoplasia when type 16 is present. Single or multiple infections associated with HPV 16 correlated significantly with a diagnosis of high-grade neoplasia even after adjustment for HPV-DNA. In fact, HPV 16 as a single or multiple-type infection merits individual consideration because it is a more potent carcinogen than the other HPV types (2, 3, 5, 14).

Women included in this study were referred because of abnormalities detected at the referral smear; therefore, they were more likely to have detectable HPV DNA due to a previous and/or current HPV infection and also to present a CIN lesion. The total prevalence of HPV detection was a little higher (86%) when that found by the study conducted by Gargiulo et al. (9) that included 213 women referred for colposcopy due to cytological cervical abnormalities and showed a total HPV prevalence of 84.9%. Similarly, a recent study conducted at a colposcopy clinic in 575 women with abnormal cervical smears reported an HPV positivity rate of 75.2% (15). In the present study, HR-HPV was detected in 92.4% of women diagnosed as \geq CIN 2, which is in agreement with the data that show that most high-grade lesions are caused by persistent HR-HPV infection (16, 17).

The overall prevalence of multiple infections in this study was higher than that of single infections; however, no statistically significant association was found between the presence of multiple infections and a diagnosis of neoplasia. In agreement with the results of this study, Ho et al. (18), failed to find a substantially increased risk associated with multiple infections, supporting the view that cervical neoplasia is the result of clonal expansion of a cell infected with a single HPV type. Gargiulo et al. (9) reported that detection of multiple HPV infection with HR-HPV types was not a significantly better predictor of cervical cancer than single HR-HPV infection. Wheeler et al. (3) reported that multiple infections with HPV genotypes resulted in a risk of CIN2/CIN3 or more severe lesions that was similar to the risk found for the HPV type with the highest risk. However, this issue remains controversial, with some studies indicating a higher risk for single or multiple-type infections (10, 11, 19, 20).

The HPV 16 was the most prevalent genotype in all final diagnosis, but principally in the more severe lesions. In addition, the association between HPV 16 in a single or multiple-type infection and a diagnosis of high grade neoplasia remained significant persisted even after adjustment for HPV-DNA. This finding is in agreement with reports from many other studies in which HPV 16 was the predominant genotype detected across all grades of histological diagnoses (21-24). Stevens et al. (17) also reported HPV 16 as the most prevalent type. This type was detected in 63.1% of cases of CIN 3; however, it was observed in only 9.3% of cases of CIN 1. Zhao et al. (25) found HPV-16 to be the most frequent HPV type in CIN lesions and squamous cell carcinoma (SCC) and reported that the prevalence of this HPV type was significantly higher in CIN2/3 and SCC compared to CIN 1.

Viral interactions in multiple-type HPV infection may have relevant implications in the assessment of oncogenic risk. There are indications that infection with multiple specific HPV types and groups acts synergistically in cervical carcinogenesis (7). In this study, a diagnosis of high-grade neoplasia was significantly associated with HPV types belonging to Alpha 9 species groups. Pitta et al. (26) also reported that women infected with HPV types belonging to the Alpha 9 species were more likely to have CIN 3 than those infected with types from the Alpha 7 species and others. Trottier et al. (7) speculated that the HPV types belonging to the Alpha 9 species, including HPV 16, HPV 58 and others, may have a faster and more extensive effect on cervical epithelia infected than with other HPV types. Fife et al. (8) suggested that HPV types 51, 52, 56, and 58 were genotypes that collaborate with HPV 16 to produce CIN or cancer. On the other hand, Bello et al. (27) observed that the effect of multiple infections on the severity of cervical lesions remained unchanged in magnitude after exclusion from the model of either HPV 16 infections or infections by the four HPV types targeted by currently available vaccines.

No association was found between a diagnosis of high-grade neoplasia and multiple-type infections that included HPV 16 and others belonging to Alpha 7 species. These data are compatible with the information on the carcinogenic potential of specific HPV types, that have been indicated that the types HPV 16, 18 and 45 are more prevalent in squamous cell carcinoma although the type 16 is also common in high grade CIN (2, 3, 5, 9).

Clustering of HPV types/species does not necessarily imply a direct biological interaction, and alternative explanations must be considered. It should be taken into consideration that broad-spectrum typing assays do not have the same specificity

and sensitivity for each viral type and it is well-known that HPV types that are present at relatively low concentrations may be under-represented by PCR because of primer competition (28).

It is well-known that persistent infections with HPV 16 are more likely to progress to cervical neoplasia; however, the present study provides evidence supporting the hypothesis that infections with other specific types, principally those belonging to the Alpha 9 group, may contribute with additional prognostic value when present in conjunction with HPV 16. The complex interrelationship of multiple HPV types requires further analysis, since it may have a direct impact on the outcome of vaccination. Likewise, as the new era of HPV vaccination begins, improved understanding of the epidemiology of HPV co-infections will also help plan HPV testing for the surveillance of immunized individuals.

REFERENCES

1. Hoory T, Monie A, Gravitt P, et al. Molecular epidemiology of human papillomavirus. *J Formos Med Assoc* 2008;107:198-217.
2. Snijders PJ, Steenbergen RD, Heideman DA, et al. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J Pathol* 2006;208:152–64.
3. Wheeler CM, Hunt WC, Schiffman M, et al; Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study Group. Human papillomavirus genotypes and the cumulative 2-year risk of cervical precancer. *J Infect Dis* 2006;194:1291–9.
4. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999;189(1): 12-19
5. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*.; 2003;89(1):101-5.
6. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324:17-27.
7. Trottier H, Mahmud S, Costa MC, et al. Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:1274–80.
8. Fife KH, Cramer HM, Schroeder JM, et al. Detection of multiple human papillomavirus types in the lower genital tract correlates with cervical dysplasia. *J Med Virol* 2001;64:550–9.

9. Gargiulo F, De Francesco MA, Schreiber C, et al. Prevalence and distribution of single and multiple HPV infections in cytologically abnormal cervical samples from Italian women. *Virus Res* 2007;125:176–82.
10. Chaturvedi AK, Myers L, Hammons AF, et al. Prevalence and clustering patterns of human papillomavirus genotypes in multiple infections. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:2439-45.
11. Liaw KL, Hildesheim A, Burk RD, et al. A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types. *J Infect Dis* 2001;183:8-15.
12. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2000;38:357–61.
13. Scully RE, Bonfiglio TA, Kurman RJ, et al. Histological typing of female genital tract tumors. In: World Health Organization. *International Classification of Tumors*. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, 1994:36-49.
14. Cottier O, Sahli R, Mihaescu A, et al. Clinical follow-up of women infected with human papillomavirus-16, either alone or with other human papillomavirus types: identification of different risk groups. *Am J Obstet Gynecol* 2009;200:286.e1-6.
15. Monsonego J, Pollini G, Evrard MJ, et al. Detection of human papillomavirus genotypes among high-risk women: a comparison of hybrid capture and linear array tests. *Sex Transm Dis* 2008;35:521–7.
16. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of

human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518–27.

17. Stevens MP, Garland SM, Tan JH, et al. HPV genotype prevalence in women with abnormal pap smears in Melbourne, Australia. *J Med Virol* 2009;81:1283-91.

18. Ho GY, Burk RD, Klein S, et al. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1365-71.

19. Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Nat Cancer Inst* 2000;92:464-74.

20. Castle PE, Solomon D, Schiffman M, et al. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1066-71.

21. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 2008;26(Suppl 10):K1-16.

22. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer* 2007;121:621–32.

23. Clifford G, Franceschi S, Diaz M, et al. HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine* 2006;24(Suppl 3):S3/26-34.

24. Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP, Amaral RG, Magalhães AV. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiânia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(2):181-4.

25. Zhao Y, Lin H, Shen D, et al. Distribution of HPV genotypes in uterine cervical lesions in Yanbian, northern China. *Pathol Int* 2008;58:643-7.
26. Pitta DR, Sarian LO, Campos EA, et al. Phylogenetic classification of human papillomavirus genotypes in high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women from a densely populated Brazilian urban region. *Sao Paulo Med J* 2009;127:122-7.
27. Bello BD, Spinillo A, Alberizzi P, et al. Cervical infections by multiple human papillomavirus (HPV) genotypes: prevalence and impact on the risk of precancerous epithelial lesions. *J Med Virol* 2009;81:703-12.
28. Spinillo A, Dal Bello B, Gardella B, et al. Multiple human papillomavirus infection and high grade cervical intraepithelial neoplasia among women with cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low grade squamous intraepithelial lesions. *Gynecol Oncol* 2009;113:115–9.

Table 1- HPV genotypes prevalence and histological diagnosis

Types	Negative n %	CIN1 n %	CIN2 n %	CIN3 n %	Invasive* n %	Total n %
16	3 (10)	8 (14.3)	7 (19.5)	12 (30)	6 (67.7)	36 (21)
16 and others	8 (26.7)	10 (17.8)	14 (38.9)	7 (17.5)	2 (22.2)	41 (24)
18 and others	1 (3.3)	3 (5.4)	3 (8.3)	-	-	7 (4.1)
31	3 (10)	4 (7.1)	1 (2.8)	3 (7.5)	-	11 (6.4)
31 and others	-	4 (7.1)	2 (5.5)	2 (5)	-	8 (4.7)
35 and others	1 (3.3)	5 (8.9)	2 (5.5)	3(7.5)	-	11 (6.4)
52 and others	-	3 (5.4)	3 (8.3)	2 (5)	-	8 (4.7)
45 and others	2 (6.7)	1 (1.8)	1 (2.8)	2 (5)	-	6 (3.5)
51 and others	3 (10)	2 (3.5)	1 (2.8)	-	-	6 (3.5)
53 and others	1 (3.3)	3 (5.4)	-	2 (5)	-	6 (3.5)
39 and others	-	3 (5.4)	-	1 (2.5)	-	4 (2.3)
33 and others	-	1(1.8)	1 (2.8)	3 (7.5)	-	5 (2.9)
58 and others	1 (3.3)	1 (1.8)	-	2 (5)	1 (10.1)	5 (2.9)
56 and others	1 (3.3)	-	-	1(2.5)	-	2 (1.2)
66 and others	2 (6.7)	1 (1.8)	-	-	-	3 (1.8)
68 and others	1 (3.3)	-	-	-	-	1 (0.6)
82	-	1 (1.8)	1 (2.8)	-	-	2 (1.2)
Low risk	3 (10)	6 (10.7)	-	-	-	9 (5.3)
Positive HPV	30 (75)	56 (84.8)	36 (92.3)	40 (90.9)	9 (100)	171(86)
Negative HPV	10 (25)	10 (15.2)	3 (7.7)	4 (9.1)	0	27(14)
TOTAL	40 (100)	66 (100)	39 (100)	44 (100)	9 (100)	198 (100)

*Invasive carcinoma included 3 cases of adenocarcinomas

Table 2- Association of HPV genotypes in single or multiple infections and histological diagnosis

HPV types and groups	Odds ratio (confidence interval 95%) comparing different histologic categories*	
	≥CIN 2	<i>p</i> -value
All high-risk HPV detected	3.00 (1.12 – 8.29)	0.01**
Multiple infections	2.49 (0.88 - 7.28)	0.06
Single infection	3.22 (1.13 - 9.48)	0.01**
HPV 16 as a single infection	6.49 (1.88 – 23.44)	0.0006**
Multiple infections including HPV 16	3.65 (1.13 -12.15)	0.014**
Single HPV 16 infection plus multiple infections including HPV 16	4.73 (1.63 – 14.17)	0.001**
All high- risk HPV except HPV 16 and 18	2.02 (0.71 – 5.97)	0.049
Single HPV 18 infection plus multiple infections including HPV 18	2.14 (0.28 – 16.34)	0.38
Single infections except HPV 16 and 18	2.47 (0.77 – 8.17)	0.09
Multiple infections except HPV 16 and 18	1.71 (0.52 – 5.76)	0.32

* Reference for odds ratio was HPV-negative.

CIN, cervical intraepithelial neoplasia; HPV, human papillomavirus.

** Statistically significant

Table 3- Association of HPV 16 and HPV 18 in single or multiple infections and histological diagnosis

HPV types and groups	Odds ratio (confidence interval 95%) comparing different histologic categories*	
	≥CIN 2	<i>p</i> -value
Single HPV infection plus multiple infections including HPV 16	2.34 (1.18 – 4.65)	0.008**
Single HPV 18 infection plus multiple infections including HPV 18	1.06 (0.17 - 6.12)	0.94

* Reference for odds ratio were HPV types other than HPV 16 and 18.
CIN, cervical intraepithelial neoplasia; HPV, human papillomavirus.

** Statistically significant

Table 4- Association of HPV types and groups according to histological diagnosis
Odds ratio (confidence interval 95%)
comparing different histologic categories*

HPV types and groups	Histologic diagnosis	
	≥ CIN 2	<i>p</i> -value
16 and group 9	7.62 (1.28 – 51.58)	0.007***
16 and group 7	2.86 (0.43 – 19.75)	0.19
16 and other types	2.22 (0.50 – 10.14)	0.22

HPV types and groups	Histologic diagnosis	
	≥ CIN 2	<i>p</i> -value
16 and group 9	3.76 (0.82 – 19.50)	0.05
16 and group 7	1.41 (0.27 – 7.36)	0.64
16 and other types	1.10 (0.33 – 3.64)	0.86

* Reference for odds ratio was HPV-negative

** Reference for odds ratio were HPV types other than HPV 16 and 18.

CIN, cervical intraepithelial neoplasia; HPV, human papillomavirus

***Statistically significant.

4. Conclusões

1. O HPV 16 foi o mais prevalente, principalmente em neoplasias intra-epiteliais de alto grau (NIC 2 e 3) e carcinomas invasores. O segundo tipo de HPV mais prevalente foi o 31, seguido pelos HPV 35, HPV 52 e HPV 18.
2. Houve uma associação significativa entre a detecção de HPV de alto risco oncogênico e diagnósticos neoplásicos de alto grau (\geq NIC 2).
3. As infecções múltiplas foram mais prevalentes que as simples, contudo, infecções simples por HPV de alto risco foram significativamente associadas com diagnósticos neoplásicos de alto grau (\geq NIC 2), enquanto que infecções múltiplas não mostram associação significativa.
4. Houve uma associação significativa entre o HPV 16, em infecções simples ou múltiplas, e diagnósticos neoplásicos de alto grau (\geq NIC 2) considerando como referência casos HPV negativos e casos HPV positivos, excluindo-se o tipo 16 e 18.
5. Os diagnósticos neoplásicos de alto grau (\geq NIC 2) foram significativamente associados com infecções por HPV 16 e outros tipos da espécie 9.

5. Referências Bibliográficas

Alves RRF. Infecção do colo uterino por múltiplos tipos do Papilomavírus humano em adolescentes sexualmente ativas: Prevalência, fatores associados e anormalidades Citológicas. Tese de doutorado. Ano de obtenção: 2006. Orientador: Prof Dr. Joaquim Caetano de Almeida Neto.

Bell MC, Schmidt-Grimminger D, Patrick S, et al. High prevalence of human papillomavirus infection in American Indian of the Northern Plains. *Gynecologic Oncology* 2008; 107 (2): 236-241.

Bello DB, Spinillo A, Alberizzi P, et al. Cervical Infections by multiple Human Papillomavirus (HPV) genotypes: prevalence and impact on the risk of precancerous epithelial lesions. *Journal of Medical Virology* 2008 81: 703-712.

Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, et al. Epidemiology and natural history of Human Papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 26S (2008) K1–K16.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. Estimativas de incidência e mortalidade por câncer no Brasil – 2008. Disponível na internet: <http://portal.saude.gov.br>. Acesso em 06/07/2009.

Brenna SMF & Syrjänen KJ. Regulation of cell cycles is of key Importance in human papillomavirus (HPV)- associated cervical carcinogenises. *São Paulo Medical Journal* 2003; 12 (3): 128-132.

Brown DR, Kjaer SK, Sigurdsson K, et al. The impact of quadrivalent human papillomavirus (HPV; types 6, 11, 16, and 18) I1 virus-like particule vaccine on infection and disease due to oncogenic nonvaccine hpv types in generally HPV-naïve women age 16-26 years. *The Journal Infections Diseases* 2009; 199: 926-935.

Burd EM. Human Papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiooyl Revew* 2003; 16 (1): 1-17.

Castle PE, Wheeler CM, Solomon D, et al. Interlaboratory reability of Hibrid Capture 2. *The American Journal of Clinical Pathology* 2004; 22: 238-245.

Cavalcanti SMB & Carestiato FN. Infecções causadas pelos Papilomavírus Humanos: atualização sobre aspectos virológicos, epidemiológicos e diagnóstico. *Jornal brasileiro de doenças transmissíveis* 2006; 18(1): 73-79.

Chaturverdi AK, Myers L, Hammons AF, et al. Prevalence and clustering patterns of Human Papillomavirus genotypes in multiple infections. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2005; 14(10):2439–45.

Clifford G, Franceschi S, Diaz M, et al. HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine* 2006;24(Suppl 3):S3/26-34.

Crum CP, Cibas ES, Lee KR. Pathology of early cervical neoplasia. New York, Churchill Livingstone, 1997.

Derchain SFM, Filho AL, Syrjänen KJ. Neoplasia intra-epitelial cervical: diagnóstico e tratamento. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 2005; 27 (2): 425-33.

DeMay RM. The Pap smear. In: DeMay RM, ed. *The Art and the Science of Cytopathology*. 1st ed. Chicago: ASCP Press; 1996:61–185.

De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17-27.

Do Carmo EFS, Fiorini A. Principais técnicas moleculares para detecção do Papilomavírus Humano. *Revista de Saúde Pública* 2007; 2(1): 29-31

Depuydt CE, Boulet GAV, Hrvat CAJ, et al. Comparison of MY09/11 consensus PCR and type-specific PCRs in the detection of oncogenic HPV types. *Journal Cellular and Molecular Medicine* 2007; 11(4): 881-891.

Einstein MH, Baron M, Levin MJ, et al. Comparison of the immunogenicity and safety of *Cervarix*TM and *Gardasil*® human papillomavirus (HPV) cervical cancer vaccines in healthy women aged 18–45 years. *Human Vaccines*. 2009; 5(10): 705-719.

Fernandes JV, Meissner RV, Carvalho MGF, et al. Prevalence of HPV infection by cervical status in Brazil. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2009; 105: 21-24.

García-Espinosa B, Nieto-Bona MP, Rueda S, et al. Genotypes distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with cervical lesions in Bioko, Equatorial Guinea. *Diagnostic Pathology* 2009; 4 (3): 1-8.

Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, et al. Improved amplificação of genital human papillomaviruses. *Journal Clinical Microbiology*. 2000; 38 (1): 357-361.

Gravitt PE, Peyton C, Wheeler C, et al. Reproducibility of HPV 16 and 18 viral load quantitation using TaqMan real-time PCR assays. *Journal of Virological Methods* 2003; 112: 23-33.

Grce M, Hunsjak K, Skerlev M, et al. Detection and typing of human papillomaviruses by means of polymerase chain reaction and fragment length polymorphism in male genital lesions. *Anticancer Research* 2000; 20: 2097-102.

Herrero R, Hildeshein A, Bratti C, et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *Journal of the National Cancer Institute* 2000;92:464-74.

Herrero R, Castle PE, Schiffman M, et al. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *Journal Infections Diseases* 2005; 191(11):1796-807.

Ho GY, Bierman R, Beardsley L, et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *New England Journal of Medicine* 1998; 338: 423-428.

Hoory T, Monie A, GravittP, et al. Molecular Epidemiology of Human Papillomavirus. *Jornal da Associação Médica de Formosa* 2008; 107(3): 198-217.

Kajaer S, Hogdall E, Frederiksen K, et al. The Absolute risk of cervical abnormalities in high-risk Human Papillomavirus-positive, cytologically normal women over a 10-year period. *Cancer Research*. 2006; 66 (21): 10630-6.

Kanodia S, Fahey LM, Kast WM. Mechanisms Used by Human Papillomaviruses to Escape the Host Immune Response. *Current Cancer Drug Targets*. 2007; 7: 79-89.

Liaw KL, Hildeshein A, Burk RD, et al. A Prospective Study of Human Papillomavirus (HPV) Type 16 DNA Detection by Polymerase Chain Reaction and Its Association with

Acquisition and Persistence of Other HPV Types. *Journal Infections Diseases*. 2001; 183: 8-15.

Massad LS, Einstein M, Myers E, et al. The impact of human papillomavirus vaccination on cervical cancer prevention efforts. *Gynecologic Oncology* 2009; 114: 360–364.

Molijn A, Kleter B, Quint W, et al. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *Journal of Clinical Virology* 2005; 32S: S43-S51.

Muñoz N, Xavier FB, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJF, Meijer CJLM 2003. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *New England Journal of Medicine* 2003; 348:518-27.

Muñoz N, Castellsagué X, González AB. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 2006; S3: 1-10.

Oliveira M, Guerra M, Bernardo F. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in silages assessed by fluorescent *in situ* hybridization. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2008; 60(1): 267-269.

Pagliusi SR, Dillner J, Pawlia M, et al. International Standart reagents for harmonization of HPV serology and DNA assays-an update. *Vaccine* 2006; 24(S3): 193-200.

Paavonen J, Naud P, Salmerón J, et al. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet* 2009; 374: 301–14.

Peitsaro P, Johansson B, Syjänen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative Real-Time PCR Technique. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40: 886-891.

Pitta DR, Sarian LO, Campos EA, et al. Phylogenetic classification of human papillomavirus genotypes in high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women from a densely populated Brazilian urban region. *São Paulo Medical Journal* 2009; 127(3): 122-127.

Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, et al. Human papillomavirus prevalence among Goiania, Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* 2003; 98: 181-184.

Ragin CC, Watt A, Markovic N, et al. Comparisons of high-risk cervical HPV infections in Caribbean and US populations. *Infectious Agents and Cancer* 2008; 4(1): 1-7.

Rousseau MC, Pereira JS, Prado JCM, et al. Cervical Coinfection with Human Papillomavirus (HPV) Types as a Predictor of Acquisition and Persistence of HPV Infection. *Journal Infections Diseases* 2001;184: 1508-1517.

Rousseau MC, Abrahamowicz M, Villa LL, et al. Predictors of Cervical Coinfection with Multiple Human Papillomavirus Types. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2003; 12: 1029-1037.

Schiffman M, Kjaer SK. Chapter 2: Natural History of Anogenital Human papillomavirus Infection and Neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute* 2003; 31: 14-19.

Schiffman M. Integration of Human papillomavirus vaccination, cytology, and human papillomavirus testing. *Cancer* 2007; 111: 145-153.

Schlecht N, Trevisan A, Duarte-Franco E, et al. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *International Journal of Cancer* 2003; 103: 519-524.

Snijders PJF, Steenbergen RDM, Heideman DAM, et al. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *Journal of Pathology* 2006; 208: 152-164.

Stanley MA. Immune responses to human papillomaviruses In Sterling, C.j. & Tyring, S.K ed Human papillomavirus – Clinical and scientific advances. Londres, Arnold; 2001:153.

Stillman MJ, Day SP, Schutzbank TE. A comparative review of laboratory-developed tests utilizing Invader HPV analyte-specific reagents for the detection of high-risk human Papillomavirus. *Journal of Clinical Virology* 2009; 45: 73-77.

Rosa MI, Medeiros LR, Rosa DD, et al. Papilomavírus humano e neoplasia cervical. *Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro* 2009; 25(5): 953-964.

Trottier H & Franco EL. Human Papillomavirus and Cervical Cancer: Burden of Illness and Basis for Prevention. *The American Journal of Managed Care* 2006; 12: S462-s472.

Trottier H, Mahmud S, Costa MC, et al. Human Papillomavirus Infections with Multiple Types and Risk of Cervical Neoplasia. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2006; 15(7): 1274-1280.

Vaccarella S, Herrero R, Snijders PJF, et al. Reproductive Factors, Oral Contraceptive Use, and Human Papillomavirus Infection: Pooled Analysis of the IARC Prevalence Surveys. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2006; 15(11): 2148-2153.

van der Graaf Y, Molijn A, Doornewaard, et al. Human Papillomavirus and the Long-term Risk of Cervical Neoplasia. *American Journal of Epidemiology* 2002; 156 (2):158-164.

Wallin KL, Wiklund F, Angstrom T, et al. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *New England Journal of Medicine* 1999; 341: 1633-1638.

Wang SS, Hildesheim H. Viral and Host Factors in Human Papillomavirus Persistence and Progression. *Journal of the National Cancer Institute* 2003; 31: 31-35.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology* 1999; 189: 12-19.

Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature reviews* 2007; 7: 8-10.

Wright TC. Pathology of HPV infection at the cytologic and histologic levels: Basis for a 2- tiered morphologic classification system. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 2006; 94: S22-S31.

Yugawa T, Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Reviews in Medical Virology* 2009; 19: 97–113.

6. Anexos

Anexo 1 – Consentimento informado

PESQUISA: *Estudo epidemiológico e Molecular da Infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) em Mulheres Portadoras de Lesões Cervicais em uma área de Alta Prevalência de Câncer do Colo Uterino - Região Centro-Oeste*

Eu, Sra _____,
idade _____, RG _____, endereço _____

_____ telefone de contato _____, registro hospitalar _____, atendida na santa casa de Misericórdia de Goiás no

Ambulatório de Oncologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia fui convidada a participar desta pesquisa porque o resultado do meu exame de prevenção (colpocitologia oncológica) mostrou anormalidades das células do colo uterino. Sei que responderei a um questionário sobre informações pessoais mantendo meu anonimato (serão avaliadas somente pelo médico que me atendeu) e que as fichas ficarão de posse do(s) Doutore(s) responsáveis pela pesquisa que são da Universidade Federal de Goiás e Santa Casa de Misericórdia de Goiás.

Sei que serei submetida à uma investigação que é necessária para esclarecer as alterações encontradas no meu exame preventivo e receber o tratamento que for preciso. Esta investigação consta de novo preventivo, e da mesma forma, será colhida secreção para descobrir se existe um tipo de vírus chamado HPV relacionado ao meu problema. Esta secreção será utilizada para fazer exames

chamado de reação em cadeia da polimerase (PCR) e também poderá ser utilizada posteriormente para outras pesquisas também relacionadas ao HPV. Será realizada também um exame colposcópico, no qual o médico vai olhar o colo do meu útero com lente de aumento, e caso seja encontrada alguma alteração, esta será biopsiada, ou seja, será retirado um pedaço muito pequeno para saber com certeza o que eu tenho. Esta biópsia é feita no ambulatório, é simples, não dói e o máximo que pode causar é um pequeno sangramento, que logo pára. Caso seja descoberto que eu tenho uma alteração mais grave serei submetida a uma retirada de pedaço maior, feito com anestesia local para que eu não sinta dor. Este procedimento também é simples, normalmente feito no ambulatório, e às vezes pode causar um sangramento maior, porém caso isto ocorra, serei tratada com segurança, pois estarei no hospital com médicos capacitados para resolver o problema. também conforme indicação do médico e de acordo com o resultado do meu exame histopatológico poderei ser submetida a uma cirurgia se este for o caso.

Todos estes exames estão indicados para o esclarecimento, diagnóstico e tratamento de possíveis lesões de colo de útero que podem estar presentes em casos como o meu. Não serei submetida a exames desnecessários, tudo será feito como normalmente se faz, de acordo com os programas de prevenção do câncer do colo uterino, e tratamento adequado. Após o diagnóstico e tratamento inicial dependendo da indicação médica, deverei retornar em intervalos de mais ou menos 6 meses para acompanhamento e controle de meu problema.

Autorizo os pesquisadores da Universidade Federal de Goiás e Santa Casa de Misericórdia de Goiás a realizarem uma cópia dos resultados dos exames de laboratório para que sejam anexados às fichas de pesquisa.

Fui esclarecida quanto ao meu direito de não participar da pesquisa e de ser atendida no ambulatório sempre que necessário. **A não aceitação na participação no estudo não implicará na perda dos direitos iniciais rotineiramente oferecidos pelo ambulatório.**

Em caso de dúvidas ou esclarecimento, tenho o direito de telefonar para as Doutoradas Silvia Rabelo (32096044), Megmar Carneiro (32096129) ou Rosane Alves. Sei que não serei paga para participar deste estudo.

Goiânia ____ de _____ de 200__

Rúbrica da paciente

Médico responsável pelo atendimento

Anexo 2- Questionário e ficha pré -codificada para conduta diagnóstica e terapêutica

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
SANTA CASA DE MISERICÓRDIA**

Estudo epidemiológico e Molecular da Infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) em Mulheres Portadoras de Lesões Cervicais em uma Alta Prevalência de Câncer do Colo Uterino - Região Centro-Oeste

Ficha pré-codificada para conduta diagnóstica e terapêutica

Ficha | _ | _ | _ | _ |

Registro | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ |

Data da primeira consulta | _ | _ | / | _ | _ | / | _ | _ |

Nome _____ complet

Idade _____

Data da última menstruação _____

Endereço: Rua _____ número _____

Bairro _____ Cidade _____

Telefone: (____) _____

Telefone para contato: (____) _____ Falar com: _____

Observação:

Informações epidemiológicas**Início da atividade sexual:****Número de parceiros:****Último Exame Realizado:****Número de gestações : _____ Abortos: _____****Tabagismo: () Sim _____ () Não _____****Número de cigarros /dia:****Uso de naticoncepcional: () Sim _____ () Não _____****Tempo de uso:****1. Diagnóstico citológico****1.1 Encaminhamento** Data |__|__ / __|__ / __|__**- Código de Citologia Oncológica de Encaminhamento****Resultado:**

I1I Negativo para Lesões Intra-epiteliais ou Malignidades

I1AI NormalI1BI Alterações celulares benignas

I3I ASC-US I4I ASC_H I5I HPV I6I NIC I I7I NIC II I8I NIC III

I9I Carcinoma escamoso invasivo

I10I AG | 11 | AG (Prov. Neop.) | 12 | AIS | 13 | Adenocarcinoma endocervical

invasivo I14I Outras neoplasias invasivas (metastáticas) I15I AIS + NICIII I16I NIC

III + AG I17I CA Adenoescamoso I18I AG endometrial I19I Adenocarcinoma

endometrial I20I Outros _____

Código: _____

1.2.Cito 2 Data __|_|/__|_|/__|_|

Número |_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

Resultado:

Código: _____

1.3 Seguimento Cito 3

Data __|_|/__|_|/__|_|

Número |_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

Obs:

Resultado:

Código: _____

Data __|_|/__|_|/__|_|

Obs:

1.4, Seguimento Cito 4

Número |_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

Resultado:

Data __|_|/__|_|/__|_|

Código: _____

Obs:

1.5. Seguimento Cito 5

Número |_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

Resultado

Código: _____

2.Colposcopia

Data __|_|/__|_|/__|_|

Código: _____

| 1 | Ausência de imagem | 2 | Epitélio aceto-branco

| 3 | Mosaico

suspeita

| 4 | Vasos | 5 | Pontilhado | 6 | Leucoplasia | 7 | Schiller positivo
atípicos

| 8 | Insuficiente | 9 | não realizado | Outros_____

3.Anátomo-patológico:

CÓDIGO DO EXAME ANÁTOMO-PATOLÓGICO

I1I Cervicite I2I Metaplasia escamosa madura I3I Metaplasia escamosa imatura
I4I alteração glandular reacional I5I atipia glandular neoplásica sem outras
especificações I6I adenocarcinoma “in situ” I7I Adenocarcinoma invasivoI7I
Carcinoma adenoescamoso invasivo I8I HPV/Condiloma I9I NIC I I10I NIC II I11I
NIC III I12I Carcinoma escamoso microinvasivo I13I Carcinoma escamoso invasivo
I14I Adenocarcinoma endometrial invasivo I15I NIC III + AIS I16I Outros_____

3.1.Biópsia de colo Inãol Isiml Data__|_|/___|_|/___|_|

Resultado:

Código:_____


3.2 CAF Inãol Isiml Data__|_|/___|_|/___|_|

Resultado:

Código:_____

MARGENS | | livres | | comprometidas

Anexo 3- Aprovação do Comitê de Ética



Goiânia, 05 de julho de 2005.

Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Goiânia

Registro CEP: 003/05

Projeto: "Estudo Epidemiológico e Molecular da Infecção Pelo Papilomavirus Humano (IIPV) em Mulheres Portadoras de Lesões Cervicais em uma Área de Alta Prevalência de Câncer do Colo Uterino - Região Centro-Oeste"

Orientador: Prof^o Ms Sílvia Helena Rabelo dos Santos

Pesquisadora: Ms Rosane Ribeiro Figueiredo, Dra. Katiúscia Zanelli da Silva, Ms Megmar Aparecida dos S. Carneiro, Dra. Suelene Brito N. Tavares, Dra. Luisa Lina Villa, Dra. Andréa Trevisan, Prof^o Luiz Carlos Zeferino, Dra. Sophie Françoise Mauricette Derchain, Dra. Maria Cristina do A. Westin e Dr. Adhemar Longatto Filho


O Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Goiânia, vem por meio deste, informá-las que o seu Projeto de Pesquisa, titulado "Estudo Epidemiológico e Molecular da Infecção Pelo Papilomavirus Humano (HPV) em Mulheres Portadoras de Lesões Cervicais em uma Área de Alta Prevalência de Câncer do Colo Uterino - Região Centro-Oeste", foi analisado e aprovado por este Comitê, de acordo com as normas e diretrizes vigentes.

Situação: Projeto Aprovado

Recomendamos fiel observância aos termos da Resolução nº 196/96, do Conselho Nacional de Saúde, durante toda a pesquisa.

Solicitamos o encaminhamento de relatórios periódicos a este Comitê de Ética em Pesquisa, informando sobre o desenvolvimento da pesquisa e resultados.

Atenciosamente,


Janeslane Ferreira Maciel
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Fone: (62) 254-1000

Anexo 4 – Artigo publicado - International Journal of Gynecological Pathology