

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM DOENÇAS INFECCIOSAS

LUCIANA BUENO DE FREITAS

**Caracterização Molecular de Papilomavírus Humano
(HPV) e Vírus Adeno-Associado (AAV) em Lesões
Intraepiteliais de Colo Uterino: Um Estudo de
Seguimento**

VITÓRIA
2014

LUCIANA BUENO DE FREITAS

**Caracterização Molecular de Papilomavírus Humano
(HPV) e Vírus Adeno-Associado (AAV) em Lesões
Intraepiteliais de Colo Uterino: Um Estudo de
Seguimento**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do grau de Doutor em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Dr^a. Liliana Cruz Spano.
Co-orientadora: Dr^a. Angélica Espinosa Miranda.

VITÓRIA
2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

F862c Freitas, Luciana Bueno de, 1983-
Caracterização molecular de papilomavírus humano (HPV) e
vírus adeno-associado (AAV) em lesões intraepiteliais de colo
uterino: um estudo de seguimento / Luciana Bueno de Freitas. –
2014.

136 f. : il.

Orientador: Liliana Cruz Spano.

Coorientador: Angélica Espinosa Miranda.

Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Papilomavírus. 2. Colo uterino – Câncer.
I. Spano, Liliana Cruz. II. Miranda, Angélica Espinosa. III.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da
Saúde. IV. Título.

CDU: 614



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
TESE DE DOUTORADO

A doutoranda LUCIANA BUENO DE FREITAS apresentou a tese intitulada “**Caracterização Molecular de Papilomavírus Humano (HPV) e Vírus Adeno-Associado (AAV) em Lesões Intraepiteliais de Colo Uterino: Um Estudo de Seguimento**” em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Doutora em Doenças Infecciosas, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu (X) **aprovar** () **reprovar** a tese para habilitar a mestre em Doenças Infecciosas LUCIANA BUENO DE FREITAS a obter o Grau de DOUTORA EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 04 de junho de 2014

Prof. Dr. Iuri Drumond Louro
(Membro Externo)

Prof. Dr. Carlos Musso
(Membro Externo)

Prof. Dr. Moises Palaci
(Membro Interno)

Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues
(Membro Interno)

Prof. Dra. Liliansa Cruz Spano
(Orientadora)

Prof. Dra. Angelica Espinosa Barbosa Miranda
(Coorientadora)

AGRADECIMENTOS

À Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, assim como todos professores, alunos e funcionários.

Ao Núcleo de Doenças Infecciosas pela estrutura e aos colegas que me apoiaram e contribuíram para a execução do projeto.

Ao Serviço de Diagnóstico Complementar, Laboratório de Anatomia Patológica, HUCAM/UFES, que realizou os exames colpocitológicos das mulheres participantes do estudo.

Ao Laboratório de Vírus Oncogênicos do Instituto Carlos G. Malbrán (Buenos Aires-AR), principalmente à Dra Alejandra Picconi, assim como toda equipe, por me receberem, treinarem e compartilharem suas experiências.

Ao Dr Robert Burk (Albert Einstein College of Medicine, NY), que se disponibilizou para meu treinamento nas técnicas de sequenciamento e análise filogenética de variantes de HPV e também a toda sua equipe em especial Zigui Chen.

À banca examinadora da qualificação, Dra Silvia Helena Rabelo dos Santos, Dra Isabel Cristina Chulvis do Val Guimarães e Dr Rodrigo Ribeiro Rodrigues, por participarem e contribuírem com o projeto de doutorado.

À banca examinadora da tese, Dr Carlos Musso, Dr Iuri Drumond Louro, Dr Moisés Palaci e Dr Rodrigo Ribeiro Rodrigues pelas contribuições na apresentação escrita da tese.

À médica ginecologista Neide Aparecida Tosato Boldrini que realizou as coletas dos espécimes cervicais e entrevistou as mulheres participantes do estudo, sempre disponível.

À Elaine de Freire Muqui e Lays Paula Bondi, que me auxiliaram na realização dos procedimentos laboratoriais e companhia no laboratório.

Às minhas orientadoras Liliana Cruz Spano e Angélica Espinosa Miranda pelo contínuo auxílio e aprendizado e por serem exemplo de pesquisadoras.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) que financiou o projeto, possibilitando a execução do mesmo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado e de doutorado sanduíche.

Aos meus amigos e família, que sempre me apoiaram. Especialmente meu noivo, pelo apoio e compreensão em todos os momentos, mesmo nos períodos de distância.

A Deus por permitir a continuidade da minha vida acadêmica, que já se estende por 12 anos, e que conceda a colheita dos frutos dessa dedicação.

RESUMO

O câncer de colo uterino (CCU), cujo agente etiológico é o papilomavírus humano (HPV), é um dos tipos de câncer mais frequentes em mulheres em todo o mundo, não só em incidência como também em mortalidade. Alguns genótipos de HPV, denominados de alto risco (HR-HPV), e suas variantes gênicas, estão mais associados à indução de lesões malignas, sendo HPV16 e 18 os mais frequentes. Algumas infecções do trato genital podem atuar como cofatores da progressão carcinogênica do CCU, porém a infecção por vírus adeno-associado (AAV) parece estar inversamente relacionada, o que pode refletir em um papel protetor no desenvolvimento do CCU induzido pelo HPV. Portanto, este estudo objetivou investigar o papel da infecção mista AAV-HPV e das variantes oncogênicas de HPV na progressão das lesões intraepiteliais de colo de útero e acompanhar a eliminação / persistência viral em relação à progressão / regressão das lesões cervicouterinas. Exames citológicos foram realizados em amostras de espécime cervical, coletadas em dois momentos, de mulheres atendidas no Hospital Universitário Cassiano Antonio Moraes – HUCAM e seguiram para tratamento conforme preconizado. DNA foi extraído pelo kit comercial QIAamp[®] DNA Mini Kit, seguindo instruções do fabricante. DNA de AAV foi investigado por PCR e nPCR e, de HPV, por PCR e Captura Híbrida[®] (CH). Genotipagem de AAV e HPV foram realizadas por RFLP e RLB, respectivamente. Dos casos encaminhados ao ambulatório de colposcopia, 57,3% tiveram citologia normal, 23,1% lesões de baixo grau e 19,6% lesões de alto grau. Dos casos com citologia normal, 78% permaneceram normais, enquanto 22% progrediram à lesão; dos casos com lesão de baixo grau, 74% regrediram para citologia normal, enquanto 78,6% dos casos com lesão de alto grau apresentaram lesão de baixo grau ou citologia normal na segunda coleta. Foram positivas para HPV, 56% e 36,5% das amostras da primeira e segunda coletas, respectivamente. Foi observada boa correlação ($\kappa=0,66$) entre os testes de PCR e CH para detecção de HPV. Os HR-HPV foram detectados em mais de 90% das amostras de ambas as coletas, sendo os mais frequentes os HPV16, 58, 51, 52 e 53. Variante não-europeia esteve associada ao desenvolvimento de lesão cervical de alto grau, enquanto a presença de AAV foi inversamente relacionada à progressão da lesão cervical induzida por HPV.

Palavras-chave: HPV, variantes, lesão cervical, AAV, PCR-RFLP, RLB

ABSTRACT

The cervical cancer (CC) is one of the most frequent types of cancer in women worldwide, not only in incidence but also in mortality, with HPV as the etiological agent. Some HPV genotypes, termed high-risk (HR-HPV) and its gene variants are more associated with the induction of malignancy in the cervix, being HPV16 and 18 the most frequent types. Some infections of the genital tract may act as cofactor of carcinogenic progression of CC, but adeno-associated virus (AAV) infection seems to be inversely related, which may reflect a protective role in the development of HPV-induced cervical cancer. Therefore, this study aimed to investigate the role of AAV-HPV mixed infection and oncogenic variants of HPV in the progression of cervical intraepithelial and to follow the viral persistence / clearance and the relation to the progression / regression of cervical lesions. Cytological examinations were performed on cervical samples, collected in two moments, of women referred to the University Hospital Cassiano Antonio Moraes – HUCAM, and all of them received treatment as recommended. DNA was extracted using QIAamp[®] DNA Mini Kit commercial kit, following manufacturer's instructions. AAV DNA was investigated by PCR and nPCR and HPV by PCR and Hybrid Capture[®] (CH). AAV and HPV genotyping were performed by RFLP and RLB, respectively. From all the cases referred to the colposcopy clinic, 57.3% had normal cytology, 23.1% low grade intraepithelial lesions and 19.6% high-grade intraepithelial lesions. Out of the normal groups, 78% remained normal, while 22% progressed to lesion; from the cases with low-grade lesion, 74% regressed to normal cytology, while 78.6% of the cases with high-grade lesion showed low-grade lesion or normal cytology in the second collection. Fifty six percent and 36.5% of the samples were positive for HPV in the first and second samples, respectively. A good correlation ($\kappa = 0.66$) between CH and PCR tests for HPV detection was observed. HR-HPV was detected in about 90% of the samples from both collections, the most common types were HPV16, 58, 51, 52 and 53. Non-European variants were associated with the development of high-grade cervical lesions, while AAV presence was inversely related to the progression of HPV-induced cervical lesions.

Key words: HPV, variants, cervical lesion, AAV, PCR-RFLP, RLB

LISTA DE SIGLAS

AAV – *Adeno-associated virus* (vírus adeno-associado)

Ad – Adenovírus

AIDS – *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (Síndrome da imunodeficiência adquirida)

ASCUS – *Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance* (atipia de célula escamosa com significado indeterminado)

ASC-H - *Atypical squamous cells—cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion* (células escamosas atípicas em que não se pode excluir lesão de alto grau)

CCU – Carcinoma de colo uterino

CR – Centro de Referência

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxi-ribonucléico)

DST – Doenças Sexualmente Transmissíveis

E – *Early* (precoce)

Et al.– *et alii*, do latim: e colegas

g – Força centrífugacional

HCMV – *Human cytomegalovirus* (citomegalovírus humano)

HHV – *Human herpesvirus* (vírus do herpes humano)

HPV – *Human papillomavirus* (vírus do papiloma humano)

HR-HPV – *High risk HPV* (HPV de alto risco)

HSIL – *High grade squamous intraepithelial lesion* (lesão intraepithelial de alto grau)

ITR – *Inverted terminal repeats* (terminações repetidas e invertidas)

kb – Kilobases

L – *Late* (tardio)

LCR – *Long control region* (região longa de controle)

LR-HPV – *Low risk HPV* (HPV de baixo risco)

LSIL – *Low grade squamous intraepithelial lesion* (lesão intraepithelial de baixo grau)

mM – Milimolar

M – Molar

NIC – Neoplasia intraepitelial cervical

nm – Nanômetros

nPCR – Nested-PCR

ORF – *Open Reading Frame* (região aberta de leitura)

PA – Puro para análise

pb – Pares de bases

PCR – *Polymerase chain reaction* (reação em cadeia pela polimerase)

pmol – Picomolar

pRb – Proteína do retinoblastoma

pTAV2 – Plasmídio com genoma integrado do AAV tipo 2

p53 – Proteína 53 supressora de tumor

RFLP – *Restriction fragment length polymorphism* (polimorfismo dos fragmentos de restrição)

RLB – *Reverse line blot* (hibridização reversa em linhas)

RNA – *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

SDS- *Sodium dodecyl salt* (duodecil sulfato de sódio)

SNP – *Single nucleotide polymorphism* (polimorfismo de único nucleotídeo)

TA – Temperatura ambiente

uds – Unidades

μL – Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fotomicrografia eletrônica do HPV.....	19
Figura 2.	Árvore filogenética dos papilomavírus.....	20
Figura 3.	Genoma do HPV.....	22
Figura 4.	Expressão de proteínas do HPV em epitélio estratificado.....	23
Figura 5.	Expressão de proteínas do HPV e replicação viral em epitélio estratificado com lesão.....	25
Figura 6.	Microscopia eletrônica de transmissão de AAV e de adenovírus Esquema da replicação do genoma do AAV.....	28
Figura 7.	Classificação da família <i>Parvoviridae</i>	28
Figura 8.	Árvore filogenética dos AAV	30
Figura 9.	Criomicroscopia eletrônica de partículas de AAV.....	30
Figura 10.	Representação esquemática do genoma completo do AAV e dos produtos dos genes <i>rep</i> e <i>cap</i>	31
Figura 11.	Esquema de infecção celular pelo AAV.....	33
Figura 12.	Fluxograma referente à metodologia.....	40
Figura 13.	Genoma do AAV e iniciadores.....	48
Figura 14.	Produto do gene <i>β-globina</i>	56
Figura 15.	Produto de PCR para HPV.....	56
Figura 16.	Produto de digestão específico para tipos mucosos de HPV.....	60
Figura 17.	Exemplo de resultado de RLB para genotipagem de HPV.....	61
Figura 18.	Produto de PCR para AAV2, 3 e 5 das amostras clínicas.....	64
Figura 19.	Digestão enzimática dos amplicons positivos para AAV.....	67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Tipos de HPV identificados na 1ª e 2ª coletas.....	59
Gráfico 2.	Frequência de AAV e HPV, separados e em infecção mista, nas duas coletas.....	68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Proteínas do HPV e suas funções.....	23
Quadro 2.	Tipos de HPV e apresentação clínica.....	25
Quadro 3.	Homologia entre os AAV.....	29
Quadro 4.	Iniciadores para reação de PCR do gene <i>β-globina</i>	42
Quadro 5.	Sequência (5'-3') dos iniciadores PGMY09/11 usados na PCR para detecção de HPV.....	43
Quadro 6.	Sequência das sondas de HPV usadas na RLB.....	46
Quadro 7.	Linhagens de HPV16 referência.....	48
Quadro 8.	Mistura para PCR para o gene <i>β-globina</i> , AAV e HPV.....	50
Quadro 9.	Programas de amplificação para o gene <i>β-globina</i> , AAV (2, 3 e 5), AAV5 e HPV.....	50
Quadro 10.	Enzimas de restrição usadas na RFLP para discriminação dos tipos 2, 3 e 5 de AAV, a partir do produto de nPCR e, tamanho dos fragmentos obtidos.....	51
Quadro 11.	Definição do desfecho da infecção.....	52
Quadro 12.	Exemplo de definição de desfecho da lesão.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Distribuição das amostras em relação ao exame citopatológico.....	55
Tabela 2.	Desfecho da lesão baseada no resultado citohistopatológico de ambas as coletas.....	55
Tabela 3.	Resultados de frequência de HPV de ambas as coletas.....	57
Tabela 4.	Comparação dos resultados obtidos para a frequência de HPV.....	57
Tabela 5.	Resultados de URL para HR-HPV e LR-HPV, obtido por CH.....	57
Tabela 6.	Resultados de URL para HR-HPV em relação ao desfecho da citologia...	58
Tabela 7.	Classificação dos tipos de HPV identificados.....	61
Tabela 8.	Relação do risco de HPV com citologia.....	61
Tabela 9.	Variantes de HPV16 em relação aos casos e controles.....	63
Tabela 10.	Mutações no genoma do HPV16 e sua localização genômica.....	63
Tabela 11.	Prevalência de AAV na 1ª e 2ª coleta.....	64
Tabela 12.	Desfecho da infecção por AAV.....	65
Tabela 13.	Dados demográficos das pacientes atendidas no ambulatório de patologia do HUCAM de acordo com o grupo citológico.....	65
Tabela 14.	Dados comportamentais da população estudada.....	66
Tabela 15.	Dados clínicos da população estudada.....	66
Tabela 16.	Distribuição dos casos positivos e negativos de AAV e de HPV nos espécimes cervicais.....	67
Tabela 17.	Prevalência de infecção mista AAV-HPV em relação ao exame citopatológico.....	68
Tabela 18.	Análise da presença ou ausência de AAV nas amostras positivas para HPV em relação aos achados citológicos.....	68

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 CÂNCER CERVICAL	18
2.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV).....	19
2.2.1 Classificação e Descrição	19
2.2.2 Genoma	21
2.2.3 Proteínas.....	22
2.2.4 Ciclo de Replicação	24
2.2.5 Implicações clínicas	25
2.3 VÍRUS ADENO-ASSOCIADO (AAV).....	28
2.3.1 Breve histórico e Classificação	28
2.3.2 Estrutura do vírion	30
2.3.3 Ciclo de Replicação	32
2.3.4 Epidemiologia e implicações clínicas.....	34
2.4 INTERAÇÃO AAV-HPV	34
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 OBJETIVO GERAL.....	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1 TIPO DO ESTUDO	39
4.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO	39
4.3 COLETA DO ESPÉCIME CLÍNICO	39
4.4 ASPECTOS ÉTICOS.....	41
4.5 EXTRAÇÃO DE DNA	41
4.6 DETECÇÃO DO GENE β -GLOBINA	41
4.7 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE HPV.....	42
4.7.1 PCR com conjunto de iniciadores PGMY	42
4.7.2 Teste de captura de híbridos.....	43
4.7.3 Genotipagem de HPV	44
4.7.4 Análise de variantes	47
4.8 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AAV	48

4.8.1 Detecção de genoma do AAV	48
4.8.2 Genotipagem de AAV	49
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
4.10 DEFINIÇÃO DE PERSISTÊNCIA DA INFECÇÃO E PROGRESSÃO DA LESÃO.....	51
5 RESULTADOS.....	54
5.1 AMOSTRAS	54
5.2 DADOS SÓCIO-DEMOGRÁFICOS, COMPORTAMENTAIS E CLÍNICOS	54
5.3 CITOLOGIA.....	54
5.4 AMPLIFICAÇÃO DO GENE β -GLOBINA.....	56
5.5 DETECÇÃO DE DNA DO HPV	56
5.6 GENOTIPAGEM DE HPV	58
5.7 ANÁLISE DE VARIANTES DE HPV16.....	62
5.8 DETECÇÃO E TIPAGEM DE AAV	64
5.9 INFECÇÃO MISTA AAV-HPV	67
6 DISCUSSÃO	70
6.1 FREQUÊNCIA DE HPV	70
6.2 FREQUÊNCIA DE AAV	75
6.3 INFECÇÃO MISTA AAV-HPV E RELAÇÃO COM CITOLOGIA	77
6.4 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	79
7 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS.....	83
ANEXOS	92
APÊNDICES	96

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma de colo uterino (CCU) é o segundo tipo de câncer mais frequente entre as mulheres em todo mundo com aproximadamente 500.000 novos casos por ano. Estudos epidemiológicos demonstraram que o HPV está presente em aproximadamente 100% deles (Bosch et al., 2002). Mais de 150 genótipos de HPV tem sido identificados e cerca de 40 deles encontram-se associados a lesões do trato genital, sendo classificados em baixo e alto risco, conforme potencial oncogênico. Dentre os tipos de alto risco, os HPV16 e HPV18 estão associados com 70% de todos os casos de CCU. Além disso, variantes moleculares dentro de um mesmo genótipo podem diferir em persistência viral e em frequência de recorrência de doença cervical e, conseqüentemente, em sua associação com o CCU.

Algumas DSTs, como infecção por clamídia e HIV parecem atuar como cofatores da progressão carcinogênica no CCU (de Sanjosé et al., 1994; Smith et al., 2002). Em contrapartida, infecção por vírus adeno-associado (AAV) parece estar envolvida na proteção contra essa evolução das lesões intraepiteliais (Ahn et al., 2006; Al-Daraji e Smith, 2009).

Alguns estudos associam o AAV ao abortamento, a doenças trofoblásticas e à infertilidade masculina, entretanto seu papel em doença humana ainda não foi comprovado (Berns & Parrish, 2007). Poucos grupos de pesquisadores no mundo têm se dedicado aos aspectos patogênicos do AAV e, no Brasil, apenas três grupos apresentam relatos deste vírus em infecções humanas (Erles et al., 1999; Kiehl et al., 2002; Freitas et al., 2009; 2012; Pereira et al., 2010).

O AAV é um vírus que depende de atividade *helper* de vírus não relacionados para que ocorra infecção produtiva e no trato genital, o HPV é o vírus *helper* mais comumente associado (Walz et al., 1997; Ahn et al., 2003; Grce et al., 2004). Estudos demonstram uma interação bidirecional entre estes dois vírus, podendo o AAV ser repressor da replicação do HPV e, sendo este o fator principal no desenvolvimento de lesões intraepiteliais uterinas, o AAV, conseqüentemente, teria propriedades supressoras de tumor (Hermonat et al., 1997; Zhan et al., 1999; Walz et al., 2002; Ahn et al., 2006). Nosso grupo de pesquisa realizou recentemente um estudo em que mostra a possibilidade de o AAV estar associado ao não desenvolvimento de lesões intraepiteliais do colo do útero nas mulheres infectadas

por HPV (Freitas et al., 2012). Considerando a persistência da infecção por HR-HPV como principal fator de risco para o desenvolvimento de CCU, o presente estudo realizou duas coletas de espécime cervical de mulheres, com intervalo mínimo de um ano, objetivando evidenciar a relação entre a infecção por AAV-HPV e a evolução das lesões intraepiteliais. Além disso, caracterizou os tipos de HPV presentes na população de estudo, comparando metodologias de detecção e descreveu variantes gênicas de HPV16. Este estudo contribui, portanto, para o conhecimento do perfil epidemiológico das infecções por AAV e infecção mista AAV-HPV fornecendo dados sobre a história natural dos vírus em mulheres atendidas no Ambulatório de Colposcopia do Hospital Universitário Cassiano Antonio Moraes, Vitória-ES.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER CERVICAL

O câncer de colo uterino (CCU) representa umas das principais causas de mortalidade em mulheres, sendo diagnosticados a cada ano aproximadamente 500.000 novos casos, a maioria em países em desenvolvimento (IARC, 2014). O controle do CCU, baseado na detecção de lesões precursoras denominadas neoplasia intraepitelial cervical (NIC), resultou, no Brasil, em uma redução na mortalidade por CC de 5,23/100.000 mulheres em 1980 para 4,66/100.000 em 2011 (INCA, 2014). Entretanto, devido a baixa sensibilidade e cobertura dos exames citológicos e colposcópicos, a taxa de mortalidade por este tipo de câncer continua elevada (Arbyn et al., 2012).

Baseando-se em estudo epidemiológicos, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) admitiram que determinados tipos de papilomavírus humano (HPV), denominados de alto risco, estão associados a aproximadamente 100% dos casos de CCU (Bosch et al., 2002). Esta constatação permite uma nova abordagem na prevenção de lesões do trato genital, a partir de detecção e genotipagem viral (Walboomers et al., 1999; zur Hausen, 2000; Bosch et al., 2002).

A infecção por HPV, por si só, não é suficiente para carcinogênese. Alguns fatores de risco relacionados ao hospedeiro participam da progressão da lesão, como tabagismo, consumo de álcool, uso de contraceptivo hormonal, alimentação pobre em betacarotenos e vitamina C e D (Trottier & Franco, 2006), assim como a idade da primeira relação sexual, o número e as características dos parceiros sexuais (Shields et al., 2004). Além do tipo de HPV, outros fatores relacionados ao vírus também desempenham papel fundamental como adjuvantes na progressão maligna, como sua persistência, carga viral, seus subtipos e variantes gênicas dos tipos de alto risco mais comumente associados ao CC (Hoory et al., 2008).

A descrição das variantes de HPV emerge como importante ferramenta na otimização de protocolos de diagnósticos, assim como para vacinas terapêuticas e em estudos epidemiológicos (Shang et al., 2011; Arroyo et al., 2012). A oncogenicidade das distintas variantes de HPV pode variar entre regiões geográficas devido a diferença na distribuição de alelos HLA na população (Xi et al., 2006; de

Araújo et al., 2009). No Brasil, alguns estudos descreveram a prevalência de DNA do HPV no trato genital relacionando as variantes filogenéticas presentes na população com a gravidade das lesões intraepiteliais (Villa et al., 2000; Cruz et al., 2004; Gheit et al., 2006; Rabelo-Santos et al., 2006; Alencar et al., 2007; Junes-Gill et al., 2008; Castro et al., 2011).

Além da infecção por HPV, algumas outras infecções do trato genital podem ter participação no desenvolvimento do CCU, como por *Chlamydia trachomatis*, HIV e HSV-2 (de Sanjosé et al., 1994; Smith et al., 2002; Al-Daraji e Smith, 2009). A infecção por AAV (vírus adeno-associado), por outro lado, parece ter uma ação protetora na progressão maligna, uma vez que foi demonstrada que proteínas do AAV podem interferir na replicação do HPV (Hermonat et al., 1997; Zhan et al., 1999; Walz et al., 2002; Ahn et al., 2006).

O presente estudo de seguimento trata da determinação de infecção por HPV e por AAV em amostras de colo uterino obtidas em intervalo de um ano, com caracterização genotípica de ambos os vírus, análise de variantes de HPV16 e da associação da infecção mista HPV-AAV no desenvolvimento de lesões intraepiteliais uterinas. A seguir serão abordadas características dos vírus HPV e AAV, separadamente.

2.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

2.2.1 Classificação e Descrição

Os papilomavírus são vírus não envelopados de 55 nm de diâmetro, com simetria icosaédrica (Figura 1) e genoma formado por DNA circular de fita dupla (DNA_{df}) com aproximadamente 8 kb (Howley & Lowy, 2007).

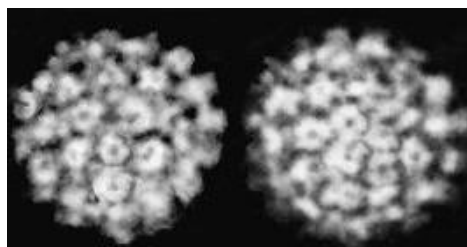


Figura 1. Fotomicrografia eletrônica do HPV. Estrutura do papilomavírus humano observado ao microscópio eletrônico de transmissão.
Fonte: CDC – NPIN (2008).

Pertencem à família *Papillomaviridae*, onde estão descritos 37 gêneros (de Villiers et al., 2004; Bernard et al., 2010, van Doorslaer et al., 2013), sendo os vírus que infectam humanos, os HPVs (*Human Papillomavirus*), pertencentes aos gêneros *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* e *Nupapillomavirus* (Figura 2).

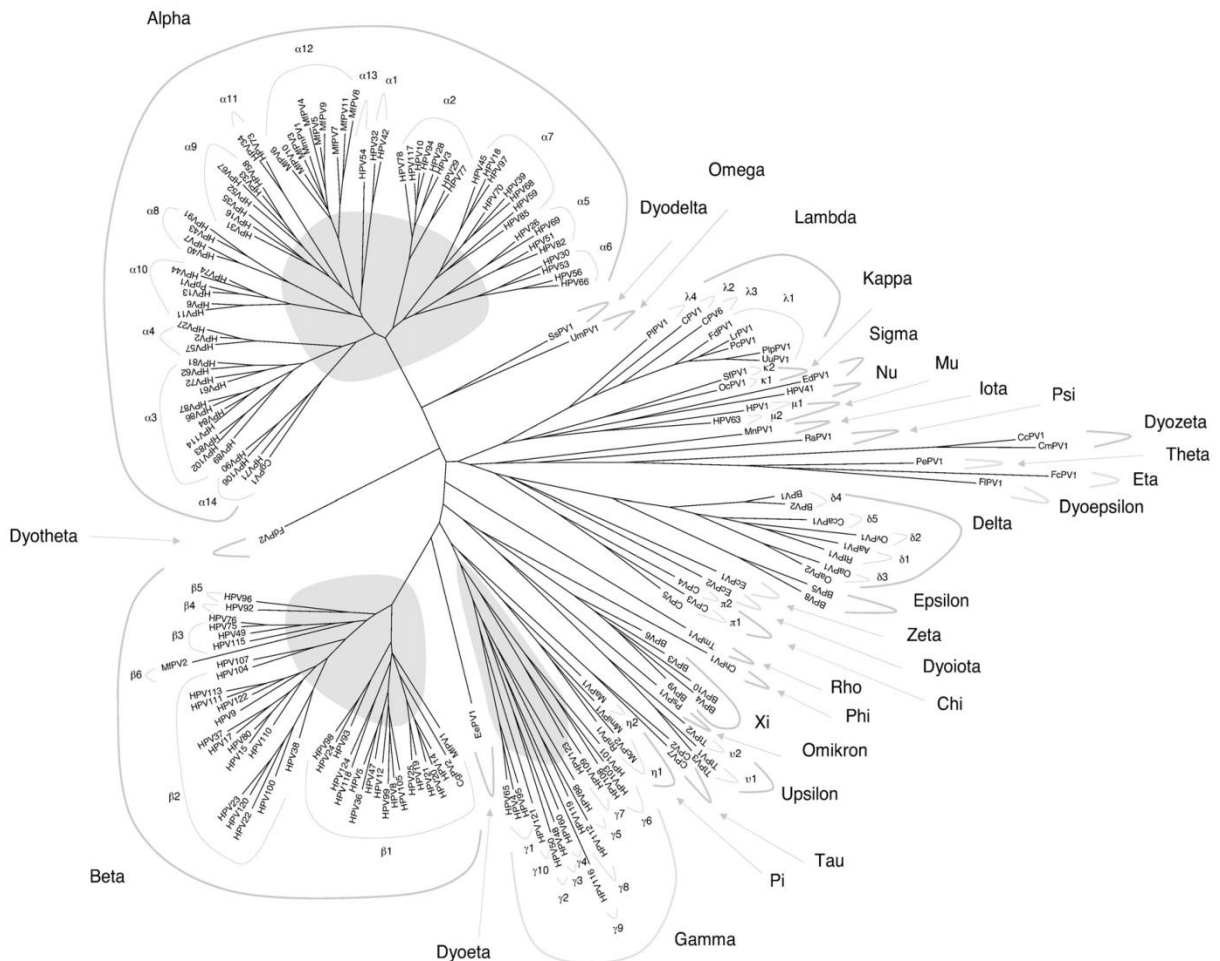


Figura 2. Árvore filogenética dos papilomavírus. Estão demonstrados os 189 genótipos descritos, com classificação baseada na sequência do gene *L1*, os gêneros e seus respectivos tipos, humanos e não humanos. Fonte: Bernard et al., 2010.

Devido à sua importância, os papilomavírus têm sido extensivamente estudados, a família apresenta 240 diferentes tipos totalmente sequenciados, sendo 189 genótipos de papilomavírus humanos (Bernard et al., 2010; HPV Center, 2014). Como o HPV é dificilmente isolado em sistemas usuais de cultivo celular, a classificação em tipos é determinada pela análise genômica, o que distingue o HPV em genótipos e não em sorotipos. Conforme critérios adotados pelo Comitê de

Nomenclatura dos Papilomavírus, uma diferença maior que 10% na região *L1* do genoma permite a classificação em um tipo diferente de HPV (de Villiers et al., 2004). O DNA da região *L1* dos membros de um gênero compartilha ao menos 60% de identidade e, quando comparado com outro gênero, difere em menos de 60%. Os papilomavírus de um único gênero que compartilham de 60-70% de identidade são designados como espécies. Dentro das espécies, um tipo viral possui 70-90% de identidade com outros tipos virais. Os subtipos possuem 90-98% de identidade e uma variante, mais de 98% de identidade em um único tipo viral (Bernard et al., 2006).

Foram descritas alterações nucleotídicas em regiões codificantes (<2%) e não-codificantes (5%) dentro de qualquer genótipo de HPV, caracterizando as variantes gênicas (Bernard et al., 2006). Essas variantes segregaram filogeneticamente com base em sua origem geográfica sendo nomeadas como variantes Europeia (E), Africana (Af), Asiática (As), Asiático-americana (AA) e Norte-americana (A) (Ho et al., 1993; Chen et al., 2005). Através da comparação das sequências nucleotídicas, tem sido possível descrever a co-evolução dos vírus HPV com os seres humanos e também reconstruir a disseminação das variantes em diferentes regiões geográficas (Bernard et al., 1994; Villa et al., 2000; Cornet et al., 2013).

Os papilomavírus são altamente espécie-específicos e os seres humanos são os únicos hospedeiros conhecidos para os HPVs (Syrjänen & Syrjänen, 2000). Apresentam tropismo por células epiteliais, sendo dependentes da diferenciação celular para que ocorra a replicação viral (Doorbar, 2006). Além da homologia genômica, os gêneros de HPV são divididos de acordo com o tropismo celular: os vírus pertencentes ao gênero *Alphapapillomavirus* possuem tropismo pelo epitélio mucoso, enquanto os do gênero *Betapapillomavirus* infectam células epiteliais cutâneas (de Villiers, 2004).

2.2.2 Genoma

O genoma circular episomal de DNA dos papilomavírus é constituído por três regiões: i) LCR (*long control region*), não codificadora, que contém promotores responsáveis pela regulação gênica; ii) precoce (E - *Early*), apresenta os genes *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7* e; iii) tardia (L - *Late*), com os genes *L1* e *L2* (zur Hausen, 2002)

(Figura 3). A organização genômica é similar entre os diversos tipos de papilomavírus. Em alguns tipos de infecções, o DNA do vírus se integra ao cromossoma do hospedeiro, tornando-se linear (Figura 3). Durante a integração, ocorre ruptura da região *E1-E2*, comprometendo o controle gênico de *E2* exercido nos oncogenes *E6* e *E7* (Syrjänem & Syrjänem, 2000; Cricca et al., 2009; Mc Bride, 2013).

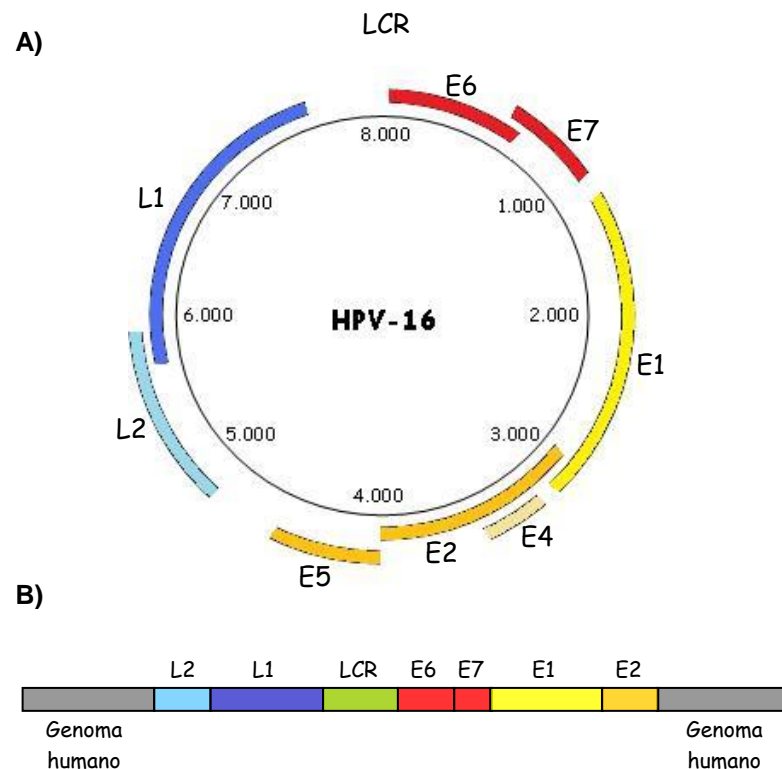


Figura 3. Genoma do HPV. Esquema do genoma circular, epissômico (A) e linear, Integrado (B) e as posições relativas dos genes. Fonte: Gross & Barrasso (1999), adaptado.

2.2.3 Proteínas

As proteínas do HPV recebem o mesmo nome de seus genes: proteínas E, não-estruturais (E1-E7) e proteínas L, estruturais (L1 e L2). Algumas das funções desempenhadas pelas proteínas virais podem ser observadas no Quadro 1. A proteína E3 é encontrada apenas no BPV-1 (*Bovine papillomavirus*) (Syrjänem & Syrjänem, 2000).

Proteínas	Função
Precoces	
E1	Replicação viral, manutenção do episossomo.
E2	Replicação e transcrição viral, transformação.
E4	Ligação às citoqueratinas.
E5	Afeta receptor para fator de crescimento epidermal.
E6	Proteína transformante, se liga à p53.
E7	Proteína transformante, se liga à pRb.
Tardias	
L1	Principal proteína do capsídeo, epítipo neutralizante.
L2	Menor proteína do capsídeo, organização.

Quadro 1. Proteínas do HPV e suas funções. Fonte: Syrjänem & Syrjänem (2000), adaptado.

A expressão das proteínas virais é fortemente regulada e dependente da diferenciação celular (Laimins, 1996). As proteínas E são expressas precocemente no ciclo replicativo do HPV, enquanto que as proteínas L, apenas nos estágios tardios da replicação, ou seja, na montagem dos vírions que ocorre nas células mais diferenciadas do epitélio (Figura 4).

Nas lesões benignas (verrugas e condilomas) as proteínas E4 e E5 são altamente expressas, enquanto nas lesões malignas (neoplasias de alto-grau e carcinoma) são expressas em maior quantidade as proteínas E6 e E7 (Syrjänem & Syrjänem, 2000).

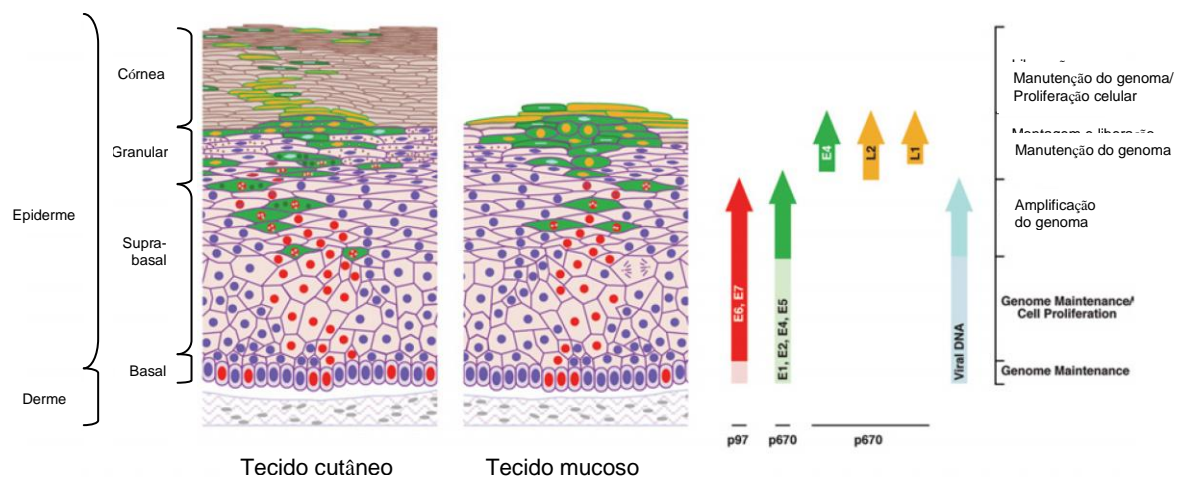


Figura 4. Expressão de proteínas do HPV em epitélio estratificado. Expressão gênica do HPV dependente da estratificação do epitélio. Fonte: Doorbar (2006), adaptado.

2.2.4 Ciclo de Replicação

A replicação viral é restrita às células do epitélio escamoso devido às funções virais de replicação, tais como síntese vegetativa do DNA viral, produção de proteínas do capsídeo e maturação dos vírions ocorrerem durante a diferenciação terminal dos queratinócitos (Figura 4) (Howley & Lowy, 2007). A infecção inicia-se com a exposição das células basais proliferativas (Stubenrauch & Laimins, 1999).

Dois modos de replicação do DNA viral são descritos para o HPV: i) manutenção da replicação durante infecção persistente nas células basais, onde o HPV mantém seu genoma em baixo número de cópias, se replicando autonomamente na forma epissomal (Lambert, 1991) e, ii) replicação vegetativa, onde o DNA é replicado durante a fase S do ciclo celular, em sincronia com o genoma da célula hospedeira a fim de gerar sua progênie (Gilbert & Cohen, 1987; Syrjänen & Syrjänen, 2000).

No início do ciclo viral, fatores celulares interagem com a LCR do HPV para iniciar a transcrição viral dos oncogenes E6 e E7. Estas proteínas expressas precocemente irão alterar o ciclo celular pela interação e inativação das proteínas supressoras de tumor: E6 se liga à proteína p53, enquanto E7 se liga à pRb. E1 e E2 são as próximas proteínas a serem sintetizadas. E2 bloqueia a transcrição precoce e permite ligação específica de E1 à origem de replicação em LCR, iniciando a replicação do genoma viral (Mohr et al., 1990; Thorner et al., 1993). Durante o processo de diferenciação do epitélio, nas camadas mais superficiais, os genes do capsídeo L1 e L2 são ativados. Neste estágio, vírions maduros já podem ser detectados na camada granular (Syrjänen & Syrjänen, 2000) (Figura 4).

Integração do DNA de HPV no genoma das células hospedeiras é considerada um importante passo na progressão maligna (zur Hausen, 1991). Esta integração tem impacto na transformação celular, na manutenção do fenótipo transformado e/ou na progressão do tumor. Interrupção da transcrição do gene E2 está usualmente associado com lesões malignas, pois na ausência de E2, as proteínas E6 e E7 permanecem sendo expressas, sustentando a imortalidade das células infectadas e ainda, bloqueando o programa de diferenciação das células epiteliais (Syrjänen & Syrjänen, 2000) (Figura 5).

Nas neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) ocorrem mudanças no padrão de expressão das proteínas, assim como na replicação do HPV, que é tanto menor quanto maior o grau de gravidade das lesões (Doorbar, 2006). Em NIC 1 quase não se observam alterações em relação ao epitélio normal, em NIC 2 e 3, entretanto, há um retardamento dos estágios tardios de replicação. Ainda, a replicação viral se restringe a uma área cada vez menor do epitélio até a não expressão das proteínas tardias e consequente ausência na produção de vírions no carcinoma cervical (CC) (Doorbar, 2006) (Figura 5).

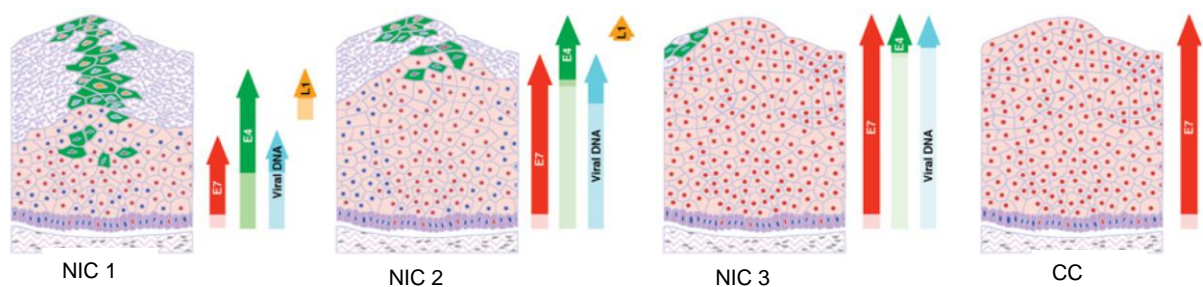


Figura 5. Expressão de proteínas do HPV e replicação viral em epitélio estratificado com lesão. Esquema demonstrando a diferença na expressão e replicação viral nos diferentes graus de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e carcinoma cervical (CC). Fonte: Doorbar (2006), adaptado.

2.2.5 Implicações clínicas

Devido à grande diversidade de tipos e ao tropismo, a infecção por HPV pode apresentar-se clinicamente de diversas formas (zur Hausen, 2002; Howley & Lowy, 2007) (Quadro 2).

SÍTIO	APRESENTAÇÃO CLÍNICA	TIPOS
Trato genital	condiloma acuminado	6, 11, 42, 43, 51, 53, 55, 83
	câncer genital (cervical e outros na região anogenital)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 69
	neoplasia intraepitelial	6, 11, 16, 18, 26, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 73, 74, 79, 81, 82, 83, 84
Trato respiratório	papiloma respiratório	6, 11
Boca	hiperplasia epitelial focal	13, 32
Pele	verruca plantar	1, 2, 4
	verruca comum	2, 4 e outros
	verruca plana	3, 10, 28, 41
	verruca do açougueiro	7
	epidermodisplasia verruciforme	5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19-25, 36, 46, 47

Quadro 2. Tipos de HPV e apresentação clínica. Fonte: de Villiers (2004), adaptado.

A infecção pelo HPV pode ser completamente inaparente, demonstrada pela detecção de DNA viral, indicando o risco para transmissão (Baseman & Koutsky, 2005). Os HPVs têm a habilidade de estabelecer latência clínica, embora ainda não esteja claro de que representem uma real latência ou persistência devido aos baixos níveis de replicação viral (IARC, 2007).

Lesões benignas incluem verrugas em região não-genital, papilomas orais e laríngeos e condilomas mucosos na região anogenital. Infecções anogenitais são principalmente transmitidas sexualmente, onde infecções persistentes podem levar à progressão para tumores (Lowy & Schiller, 2006). Mulheres jovens sexualmente ativas frequentemente se infectam com HPV, cerca de 80%, e então o vírus é eliminado espontaneamente (Baseman & Koutsky, 2005).

O condiloma ocorre com maior frequência em adultos jovens, sexualmente ativos e em populações sexualmente promíscuas (Strickler et al., 1999). Cerca de 40 tipos de HPV estão relacionados e estão divididos nas categorias “alto-risco” (HR-HPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 70, 73, 82), “provável alto-risco” (26, 53) e “baixo-risco” (LR-HPV: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81, 89) baseadas no risco de progressão para lesões malignas que induzem na cérvix (Munõz et al., 2000, 2002; Hoory et al., 2008) (Quadro 2). Estudos de prevalência apontam os genótipos 16 e 18 como os mais frequentes, responsáveis por 70% dos casos de CC (Bosch et al., 1995; Muñoz et al., 2000).

Variabilidade nos nucleotídeos tem sido amplamente estudada e diferentes variantes moleculares foram demonstradas para HPV16 e HPV18. Estas variantes diferem em suas propriedades biológicas e químicas e podem então, se tornar um fator de risco importante na progressão do câncer cervical, devido a diferenças na patogenicidade (Souza et al., 2009; Sichero et al., 2007; López-Saavedra et al., 2009). Tem sido demonstrado, mais claramente para HPV16, que suas variantes diferem na associação com CC, com persistência viral e com frequência de recorrência de doença cervical (Tidy et al., 1989; Londesborough et al., 1996; Zehbe et al., 1998; Berumen et al; 2001; Ferenczy & Franco, 2002; Xi et al., 2006 e 2007; Sichero et al., 2007; Lee et al., 2008). As variantes não-europeias são associadas em maior frequência com lesões intraepiteliais de alto grau e com CC (Schiffman et al., 2010).

Assim como para HPV16, foi sugerido que variantes não-europeias de HPV18 persistem em maior frequência e estão associados com lesões pré-invasoras (Villa et al., 2000). HPV18 apresenta três variantes distribuídas mundialmente, classificadas em Asiático-Ameríndia (AsAi), Africana (Af) e Europeia (Ong et al., 1993).

O conhecimento sobre as variantes de HPV e a sua variabilidade nucleotídica é importante pois além das alterações nucleotídicas poderem interferir no potencial oncogênico do vírus, substituição de aminoácidos no envelope viral pode ter implicações na resposta do hospedeiro e eficácia na vacinação (Arroyo et al., 2012).

2.3 VÍRUS ADENO-ASSOCIADO (AAV)

2.3.1 Breve histórico e Classificação

O AAV foi descrito pela primeira vez em 1965, contaminando cultivo de adenovírus (AdV) (Atchison et al., 1965) (Figura 6) e, posteriormente, considerado como vírus satélite deste (Hoggan et al., 1966; Bantel-Schaal & zur Hausen, 1984).

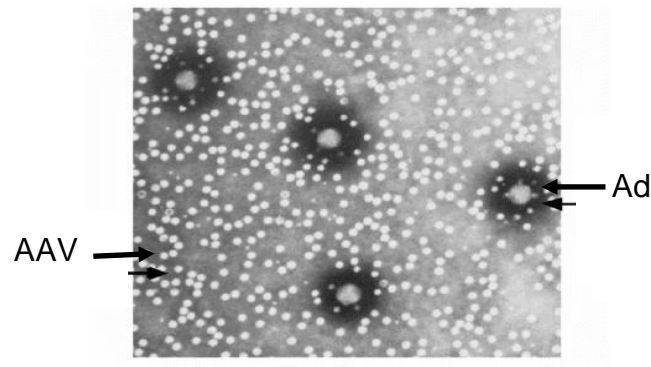


Figura 6. Microscopia eletrônica de transmissão de AAV e de adenovírus. Fotomicrografia eletrônica após contrastação negativa de partículas de AdV e AAV obtidas de cultivo celular coinfestado. Fonte: Dani (1999).

O AAV pertence à família *Parvoviridae* e sub-família *Parvovirinae*, com seus três gêneros, *Erythrovirus*, *Bocavirus* e *Dependovirus*, onde estão classificadas as únicas espécies de parvovírus que causam infecção em humanos: B19, bocavírus humano e AAV, respectivamente (Figura 7).

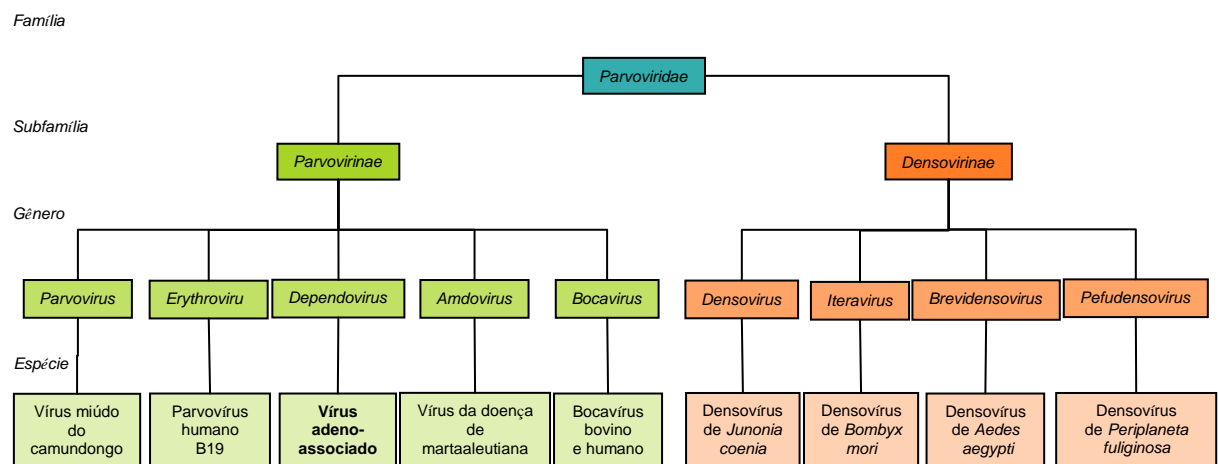


Figura 7. Classificação da família *Parvoviridae*. Fonte: ICTV, 2012.

São reconhecidas doze espécies de AAV em primatas, designadas AAV1 a AAV12, comumente referidas como “tipos”, sendo o AAV2 a espécie/tipo protótipo (Blacklow et al., 1967; Parks et al., 1970; Samulski et al., 1982 Laughlin et al., 1983; Bantel-Schaal & zur Hausen, 1984; Muramatsu et al., 1996; Chiorini et al., 1997 e 1999; Rutledge et al., 1998; Xiao et al., 1999; Gao et al., 2002 e 2004; Mori et al., 2004; Schmidt et al., 2008). Os demais tipos são descritos como apresentando homologia baixa, intermediária, alta ou muito alta em relação ao AAV2 (Mizukami & Ozawa, 2006) (Quadro 3). Análises das proteínas de capsídeo dos diferentes tipos virais indicam que o AAV4 e o AAV5 são os mais divergentes dentre os tipos já isolados, exibindo somente 60% de homologia com o AAV2 ou entre si (Kaludov et al., 2001); AAV10 e AAV11 apresentam 84% e 65% de homologia com o AAV2, respectivamente (Mori et al., 2004). O último tipo descrito, AAV12, possuía maior homologia com os tipos 4 e 11, 83% e 81%, respectivamente e, com o AAV5, a menor taxa de similaridade observada (63%) (Schmidt et al., 2008), conseqüentemente levando a uma baixa homologia com o AAV2, de apenas 60%. A homologia também pode ser relacionada à evolução dos AAV, gerando-se uma árvore filogenética a partir de sequenciamento gênico parcial dos genes *rep* e *cap* (Figura 8).

Tipo	Homologia com AAV2	Referência
AAV1	Alta	Atchison et al.(1965)
AAV2	-	Hoggan et al.(1966)
AAV3	Muito alta	Hoggan et al. (1966)
AAV4	Baixa	Parks et al.(1967)
AAV5	Baixa	Bnatel-Schaal et al. (1984)
AAV6	Alta	Rutledge et al. (1998)
AAV7	Intermediária	Gao et al.(2002)
AAV8	Intermediária	Gao et al.(2002)
AAV9	Intermediária	Gao et al.(2004)
AAV10	Intermediária	Mori et al. (2004)
AAV11	Baixa	Mori et al.(2004)
AAV12	Baixa	Schmidt et al. (2008)

Quadro 3. Homologia entre os AAV. Homologia gênica entre os tipos de AAV e a espécie protótipo AAV2. Fonte: Mizukami & Ozawa (2006), adaptado.

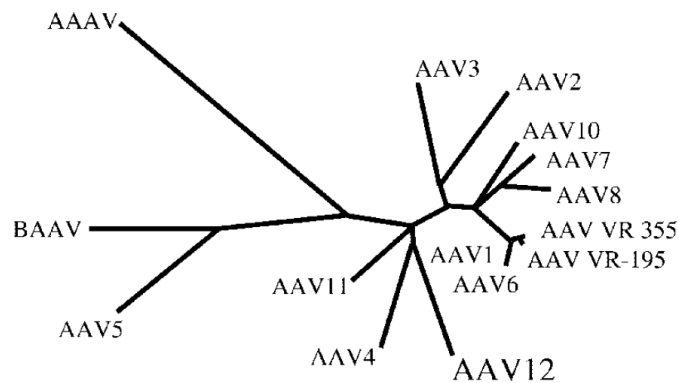


Figura 8. Árvore filogenética dos AAV. Relação evolutiva entre os AAV, os tamanhos dos ramos são proporcionais à distância evolutiva entre os tipos virais. AAVV (AAV aviário), BAAV (AAV bovino), AAV VR (variante).
Fonte: Schmidt et al. (2006, 2008).

Dos doze tipos descritos, os AAV2, AAV3, AAV5 e AAV9 foram os únicos relatados em amostras de origem humana, incluindo sangue, medula óssea, *swab* anal, secreção orofaríngea, conjuntiva, biópsia cervical, raspado de cérvix uterina, endométrio, sêmen e espécimes de aborto espontâneo e testicular (Schmidt et al., 1975; Blacklow et al., 1967; Grossman et al., 1992; Tobiasch et al., 1994; Malhomme et al., 1997; Walz et al., 1997, 1998; Rhode et al., 1999; Erles et al., 2001; Gao et al., 2004; Pereira et al., 2010).

2.3.2 Estrutura do vírion

O AAV é um vírus pequeno, com 18 a 26 nm de diâmetro, de simetria icosaédrica, não envelopado (Muzyczka & Berns, 2001) (Figura 9).

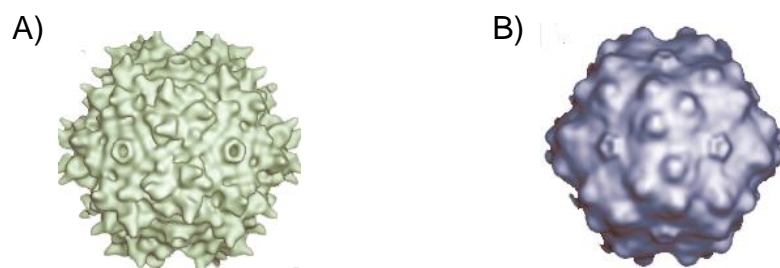


Figura 9. Criomicroscopia eletrônica de partículas de AAV. Reconstrução dos capsídeos por criomicroscopia eletrônica 3D. A) AAV2, B) AAV5. Fonte: Walters et al. (2004).

O genoma é constituído por uma fita simples de DNA de 4,7 kb com números equivalentes de fitas encapsidadas de polaridade positiva ou negativa (Berns & Parrish, 2007). O DNA é flanqueado por regiões repetidas e invertidas (ITR - *inverted terminal repeats*) (Glauser et al., 2005) (Figura 10) e os primeiros 125 nucleotídeos das ITR formam sequências palindrômicas (Berns & Parrish, 2007).

Duas grandes regiões abertas de leitura (ORF - *open reading frames*) são identificadas no genoma do AAV (Berns, 1990) (Figura 10). Na ORF esquerda se localiza o gene *rep*, que codifica quatro proteínas não estruturais denominadas Rep78, Rep68, Rep52 e Rep40, de acordo com seu peso molecular (Mendelson et al., 1986). Na ORF direita, se localiza o gene *cap*, que codifica as três proteínas do capsídeo: VP1, VP2 e VP3 (Berns & Parrish, 2007) (Figura 10).

A diferenciação em tipos do AAV se dá pela homologia em uma região do genoma denominada “região de assinatura” que corresponde a uma porção de 255 pb no gene *cap* altamente conservada nas extremidades 5' e 3', mas variável e única na porção interna em cada espécie (Gao et al., 2002).

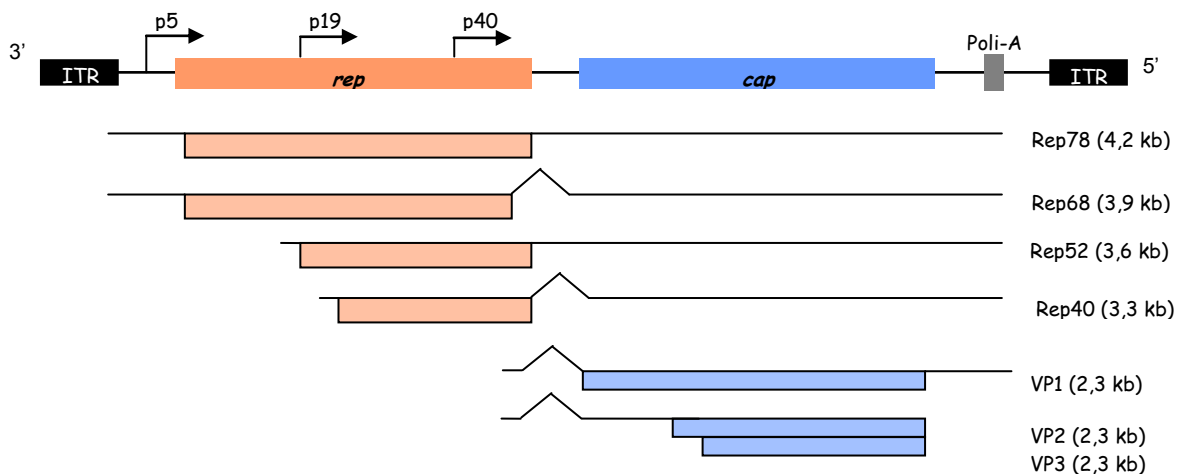


Figura 10. Representação esquemática do genoma completo do AAV e dos produtos dos genes *rep* e *cap*. Fonte: Schlehofer (1994), adaptado.

Somente duas classes de proteínas são encontradas no AAV, as proteínas Rep (não estruturais) e as proteínas Cap (do capsídeo). As proteínas Rep são proteínas multifuncionais que estão intimamente envolvidas em várias etapas do ciclo de replicação do AAV, incluindo replicação do DNA viral, transcrição, empacotamento e integração proviral ao cromossomo 19 humano. Rep78 e Rep68 são proteínas predominantemente nucleares, exibem funções celulares *in vitro*, se ligando a

sequências específicas do DNA de fita dupla, atuando como DNA helicase ATP-dependente e endonuclease específica para DNA de fita simples (Im & Muzyczka, 1989, 1990). As menores proteínas Rep, 52 e 40, atuam na montagem do vírion, estimulam o acúmulo de DNA de fita simples da progênie viral durante a infecção, sugerindo a participação de ambas no empacotamento do genoma viral, encontradas principalmente no citoplasma (Chejanovsky & Carter, 1989; King et al., 2001).

2.3.3 Ciclo de Replicação

O ciclo de replicação do AAV inicia através da adsorção a receptores de superfície, proteoglicanos sulfato de heparana (HSPGs) ou ácido siálico, seguido por penetração via endocitose mediada por correceptores para fator de crescimento 1 de fibroblastos e integrina $\alpha V\beta 5$ (Qing et al., 1999; Summerford et al., 1999).

A endocitose ocorre por vesículas revestidas com clatrina, e então o vírion é transportado até o citoplasma por via endossomal (Wang et al., 1998; Duan et al., 1999), mediado por microtúbulos e citoesqueleto seguido por transporte ao interior do núcleo para replicação por um processo ativo (Berns & Parrish, 2007).

As sequências palindrômicas das ITRs atuam como iniciadores da replicação de DNA do AAV (Lusby et al., 1980; Srivastava et al., 1983). As proteínas Rep, em suas várias formas, possuem várias funções na replicação do AAV, entretanto, não possuem atividade de DNA polimerase ou de proteína ligadora de DNA de simples fita, portanto, fatores adicionais são necessários (Berns & Parrish, 2007). Provavelmente, estas funções são desempenhadas por proteínas celulares ou dos vírus *helper*, ou ainda por ambos. A replicação ocorre com o desarranjo da simples fita de DNA, não sendo observada a formação de fragmentos de Okasaki (Wonderling et al., 1995).

As proteínas Rep68/78 podem estimular ou inibir a replicação do vírus conforme condições celulares. Na presença de vírus *helper* são transativadoras essenciais na expressão gênica do AAV, resgatando-o de seu estado integrado (Berns & Parrish, 2007). Os AAV são os únicos dentre os vírus que causam infecção em humanos que necessitam de função *helper*, além do AdV, outros vírus foram descritos desempenhando esta função como o herpes simples, o herpesvírus humano tipo 6

(HHV6), o citomegalovírus humano (HCMV), o vírus da vaccínia ou o HPV para que ocorra infecção produtiva em cultura de células (Buller et al., 1981; McPherson et al., 1985; Schlehofer et al., 1986; Thomson et al., 1994; Walz et al., 1997). As proteínas precoces dos vírus *helper* foram demonstradas exercer a função requerida para replicação do AAV (Ogston et al., 2000; Berns & Parrish, 2007).

Na ausência de vírus *helper*, o AAV estabelece infecção latente em cultura de células, integrando o genoma viral no cromossoma 19 humano, *locus* AAVS1 (Cheung et al., 1980; Kotin & Berns, 1989; Kotin et al., 1991; Muzyckza et al., 1992; Weitzman et al., 1994; Hüser & Heilbronn, 2003) (Figura 11, 3a). Rep68 e Rep78 se ligam a regiões vizinhas ao sítio de integração do AAV no cromossoma 19, e estão envolvidas na integração específica (Weitzman et al., 1994).

Foi descrita ainda a manutenção do genoma viral como epissomo circular em células humanas (Schnepp et al., 2005). A superinfecção com vírus *helper* pode iniciar a infecção produtiva (Cheung et al., 1980) (Figura 11, 3b). Entretanto, replicação autônoma do AAV foi observada em células embrionárias e em queratinócitos em diferenciação, na ausência de vírus *helper*, sugerindo que as células em diferenciação fornecem ao vírus os fatores de transcrição necessários à sua replicação (Burguete et al., 1999; Meyers et al., 2000; Kiehl et al., 2002). Além disso, estudos demonstraram que células tratadas com agentes genotóxicos, como radiação UV, ciclo-heximida e hidroxauréia, se tornaram permissivas à infecção por AAV na ausência de coinfeção (Yalkinoglu et al., 1988). Este estresse altera a maquinaria intracelular permitindo que ocorra a replicação do AAV (Berns & Parrish, 2007).

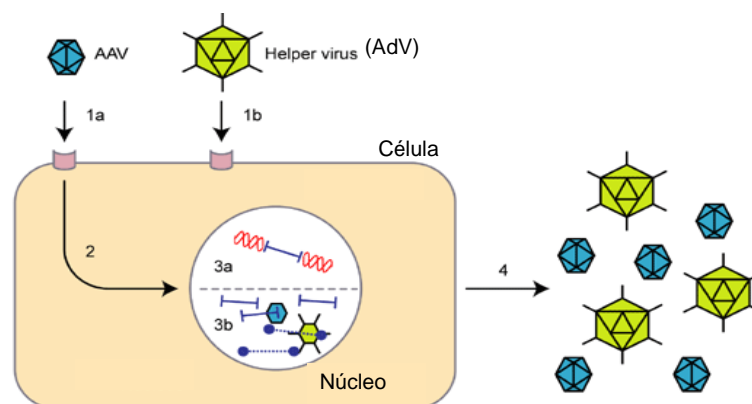


Figura 11. Esquema de infecção celular pelo AAV. Adsorção e penetração de AAV (1a) e de vírus *helper* (1b); (2) transporte para o núcleo; (3a) integração do AAV na ausência de vírus *helper* e (3b) replicação de AAV em presença de vírus *helper*; (4) liberação dos vírions. Fonte: Adaptado de Blechacz & Russel (2004).

2.3.4 Epidemiologia e implicações clínicas

Estudos epidemiológicos relatam uma soroconversão precoce e uma alta soroprevalência em população adulta, variando de 10-80% de acordo com a idade dos indivíduos (Blacklow et al., 1968; Tratschin et al., 1985; Grosmann et al., 1992; Erles et al., 1999). Apesar de terem sido descritos em diversos espécimes clínicos, o AAV ainda não foi comprovadamente associado a qualquer doença humana (Berns & Parrish, 2007). Por este motivo e pela sua capacidade de integração ao genoma humano, tem sido extensivamente pesquisado para uso como vetor em terapia gênica (Balakrishnan & Jayandharan, 2014). Alguns estudos em que o AAV foi detectado em amostras clínicas, foi sugerida sua participação em casos de abortamento humano, trabalho de parto prematuro, amniorrexe, casos de doença trofoblástica, amostras de placenta associada com pré-eclâmpsia e na infertilidade masculina (Walz et al., 1997; Burguete et al., 1999; Kiehl et al., 2002; Arechavaleta-Velasco et al., 2006, 2008; Pereira et al., 2010; Rohde et al., 1999; Erles et al., 2001). Logo, estes relatos sugerem que o AAV desempenharia um papel como complicador no trato reprodutivo humano.

2.4 INTERAÇÃO AAV-HPV

Em epitélio cervical, conforme anteriormente descrito, tem sido observada infecção importante de AAV com HPV, mais frequente do que com os outros vírus *helper* (Walz et al., 1997; Ahn et al., 2003; Grce et al., 2004; Freitas et al., 2009). Produtos dos genes *E1*, *E2* e *E6* do HPV apresentam atividade estimuladora em todo o ciclo de replicação do AAV, sendo o gene *E1* o principal estimulador da replicação do AAV2, de forma dose-dependente, em cultura de queratinócitos em diferenciação (You et al., 2006).

Ação supressora do AAV na replicação do HPV foi posteriormente demonstrada *in vivo* e *in vitro*, evidenciando, portanto, uma atividade bidirecional entre eles (Hermonat et al., 2000; Ogston et al., 2000; Smith et al., 2001; Agrawal et al., 2002; Walz et al., 2002; Ahn et al., 2003; Hermonat et al., 2005; You et al., 2006).

Estudos *in vitro* demonstraram que a proteína Rep78 do AAV é a principal responsável pela regulação negativa de promotores, como o p97, dos tipos 16 e 18 de HPV, inibindo a transformação oncogênica dos papilomavírus (Hermonat et al.,

1997; Zhan et al., 1999; Walz et al., 2002; Ahn et al., 2006). Por outro lado, Agrawal et al. (2002) demonstraram que todas as quatro proteínas Rep de AAV, expressas individualmente em plasmídios, exerceram estímulo ao crescimento de HPV em cultura de células de queratinócitos em diferenciação. Porém, a participação desta alteração pelo AAV na cinética do HPV e na progressão para CC, ainda não são conhecidos. A ação repressora ou estimuladora do AAV na expressão e na capacidade transformante oncogênica do BPV (papilomavírus bovino) foi demonstrada *in vitro* ser dependente do intervalo de tempo entre a infecção pelos dois vírus, sendo que quanto menor o tempo da infecção prévia pelo AAV, maior a inibição do BPV (Hermonat et al., 1998). Entretanto, não se conhece como ocorreria temporalmente *in vivo* a interação repressora/estimuladora bidirecional AAV-HPV.

Foi ainda observado que a proteína Rep78 do AAV e a proteína E1 do HPV interagem fisicamente, *in vitro*, formando um complexo hetero-oligomérico, que culmina com a redução da atividade ATPásica, alterando desta forma, mutuamente, a função biológica de ambas as proteínas (Bandyopadhyay et al., 2008).

Como o AAV inibe a replicação do HPV, existe a possibilidade de o AAV ser repressor da tumorigênese cervical induzida pelo HPV (Agrawal et al., 2002; Al-Daraji & Smith, 2009). De fato, foi observada uma correlação inversa entre a infecção pelo AAV e o desenvolvimento de CC, evidenciado através de uma soroprevalência menor para AAV neste grupo de pacientes (Smith et al., 2001). Infecção pelo AAV foi também associada com menor risco para o desenvolvimento de lesão intraepitelial de alto risco, através da detecção do ácido nucléico de AAV, por PCR, em secreção cervical de pacientes com lesão intraepitelial de baixo e de alto-grau infectadas por HPV (Coker et al., 2001; Agorastos et al., 2008; Freitas et al., 2012).

Até o momento, permanece obscuro o mecanismo de regulação induzida por AAV na expressão gênica e no ciclo de vida do HPV. Logo, mais estudos são necessários para esclarecer a ação supressora do AAV na transformação celular, induzida por HPV, em epitélio escamoso cervical, o que trará importante contribuição no estudo da supressão da tumorigênese cervical.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar o papel da infecção mista AAV-HPV e de variantes oncogênicas de HPV na progressão das lesões intraepiteliais de colo de útero.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar métodos moleculares de detecção de HPV;
- Identificar tipos de HPV em espécimes de seguimento e classificá-los como de alto ou baixo risco oncogênico;
- Classificar infecção por HPV como persistente ou resolvida;
- Identificar variantes de HPV;
- Detectar DNA de AAV, discriminando os tipos AAV2, 3 e 5;
- Determinar as frequências de infecção por AAV e HPV um ano após a primeira coleta de amostras;
- Descrever infecção mista AAV-HPV e relação com os resultados citológicos;
- Relacionar as infecções virais, descritas em dois momentos, com a evolução / regressão das lesões citopatológicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TIPO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo de coorte prospectiva realizado com mulheres atendidas no Ambulatório de Colposcopia do Hospital Universitário Cassiano Antonio Moraes (HUCAM), Vitória, ES.

As amostras foram coletadas em dois momentos para acompanhamento dos casos de infecção por AAV e HPV, sendo a 1ª coleta no período de abril de 2010 a outubro de 2011 e a 2ª coleta, 1 ano após a primeira visita, independente do resultado obtido para cada vírus, com encerramento em janeiro de 2014.

4.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram incluídas neste estudo mulheres com idade entre 18 e 59 anos, encaminhadas ao ambulatório de colposcopia do HUCAM por apresentarem resultado citológico alterado. Os critérios de exclusão para a entrada no estudo, adotados na 1ª coleta, foram gestação, soropositividade para HIV e histerectomização. As coletas do espécime clínico para pesquisa foram obtidas após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.3 COLETA DO ESPÉCIME CLÍNICO

Uma única médica ginecologista (Neide Aparecida Tosato Boldrini) realizou a coleta de amostras de endocervix uterino utilizando escova ginecológica (*cytobrush*). As amostras foram encaminhadas, para exames citológico e histopatológico, ao Serviço de Diagnóstico Complementar, Laboratório de Anatomia Patológica do HUCAM. Questionário estruturado foi aplicado para obtenção de dados sócio-demográficos pela mesma investigadora (Anexo A).

Além da coleta para exame de citopatologia, outras duas amostras de escovado endocervical foram coletadas de cada paciente para os procedimentos de diagnóstico por biologia molecular: uma acondicionada em criotubos contendo 1,5 mL de tampão TE 1X (Tris 10mM, EDTA 1mM - pH 7,0) para realização da PCR e a outra, em tubo de 2mL contendo meio de transporte comercial (STM™, QIAGEN)

para ensaio de captura de híbridos. Os espécimes foram transportados, sob refrigeração, para o Laboratório de Virologia (LabVir) do Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI-UFES) e mantidos a 4-8° C (amostra em STM) a -70° C (amostra em TE) até o processamento. Em todas as amostras foram investigadas infecção por AAV e por HPV através da pesquisa de DNA viral, descrita a seguir.

No período de um ano após a primeira coleta de amostra, as pacientes foram convidadas a realizar uma nova coleta de escovado endocervical para analisar resolução e / ou persistência da infecção, assim como para acompanhamento da evolução da citologia cervical (Figura 12).

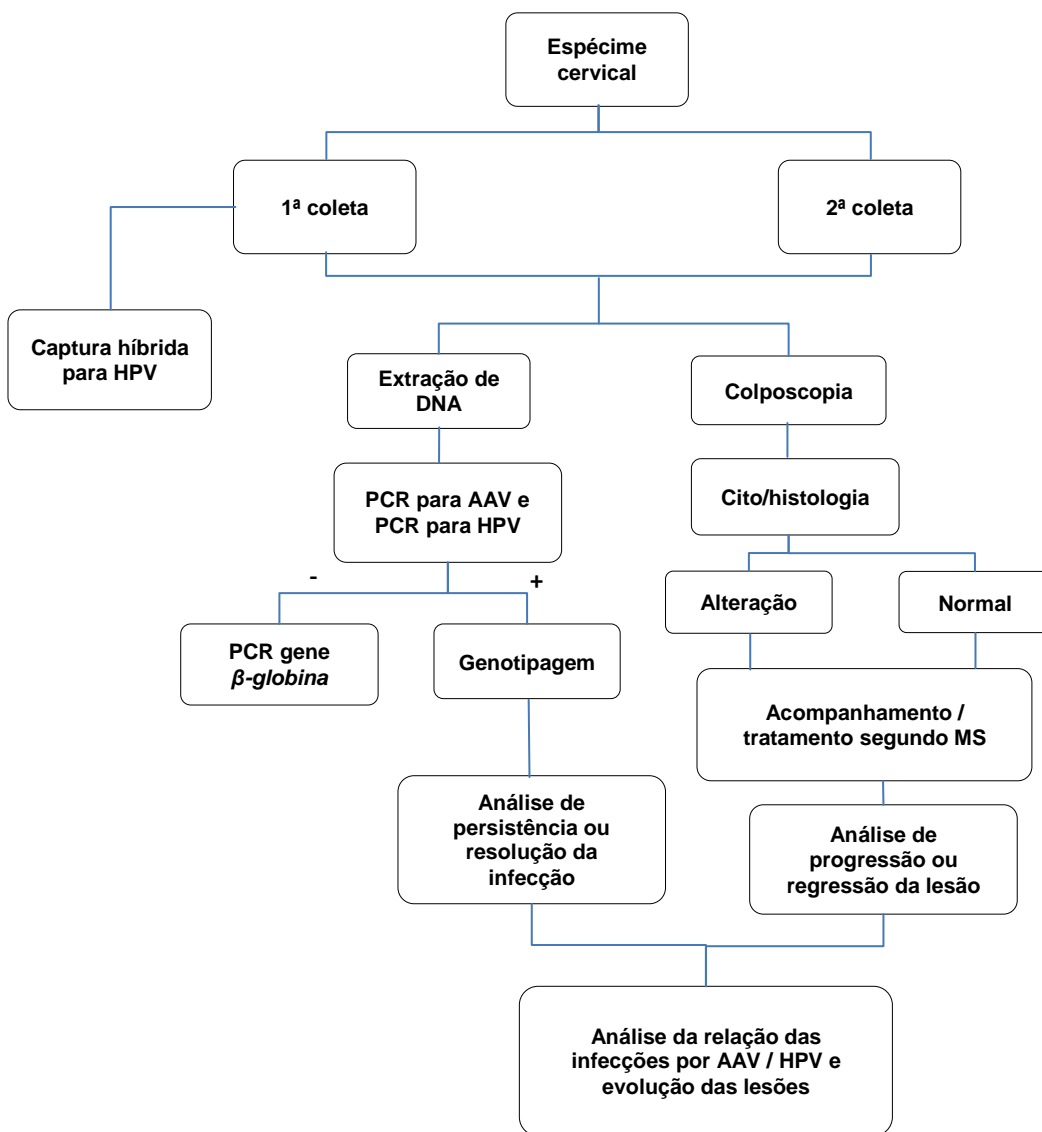


Figura 12. Fluxograma referente à metodologia.

4.4 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo obteve aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde - UFES, na data de quatro de novembro de 2009, sob o número 086/09 (Anexo B).

4.5 EXTRAÇÃO DE DNA

Extração do DNA da amostra clínica foi realizada utilizando o kit de extração QIAamp[®] DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, USA) para sangue e fluidos biológicos, segundo instruções do fabricante e descrita a seguir. A 200 µL de espécime cervical homogeneizada foram adicionados 20 µL de proteinase e 200 µL de tampão de lise. Este tampão contém sais de guanidina, responsável pela lise celular e dissociação da nucleoproteína viral. A mistura foi homogeneizada durante 10 s, incubada à 56°C por 10 min e centrifugada rapidamente. Foram adicionados 200 µL de etanol PA aos tubos contendo amostra, e então foram homogeneizados e centrifugados rapidamente. Esta solução foi aplicada à coluna contendo matriz de sílica e centrifugada a 6000 x g, durante 1 min. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor descartando-se o filtrado e a ela foram adicionados 500 µL de tampão AW1, centrifugada a 6000 x g por 1 min e transferida para um novo tubo coletor, descartando-se novamente o filtrado. À coluna foram adicionados 500 µL de tampão AW2 e centrifugada a 20000 x g durante 3 min. A coluna foi transferida para novo microtubo, descartando-se o filtrado. Foram adicionados à coluna 60 µL de tampão AE, para eluição do DNA, seguido por incubação à TA por 5 min e centrifugação a 6000 x g durante 1 min. Esta solução final contém o DNA do material clínico e foi mantida em refrigeração (-20°C) até a realização da detecção dos genomas virais.

4.6 DETECÇÃO DO GENE β -GLOBINA

Amplificação do gene β -globina foi utilizada como controle da extração e da integridade do DNA obtido nos casos em que PCR para HPV foram negativos. Dois microlitros do DNA extraído foram adicionados a 23µL da mistura de reação para PCR, conforme determinado anteriormente neste laboratório (Freitas et al., 2009), e submetido à reação de amplificação do gene β -globina (Huang et al., 1989) (Quadro

4). As concentrações da mistura de reação bem como o programa utilizado para amplificação do material genético estão apresentados nos Quadros 5 e 6.

Os produtos da amplificação foram observados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio (EtBr) 0,5 µg/mL e observados sob luz UV no sistema de documentação de imagens MiniBisPro[®] (BioAmérica Inc., Brasil).

Como controles negativos das reações de amplificação, foram utilizados extração de água, paralelamente à extração da amostra clínica, e mistura de reação com água estéril livre de RNase e DNase, adicionada em lugar da amostra. Todos os cuidados necessários foram tomados durante as etapas de extração: o preparo da mistura de reação e a aplicação das amostras foram realizados em salas distintas para evitar reações falso-positivas. Todas as reações de amplificação foram realizadas no termociclador *Perkin Elmer[®] GeneAmp PCR System 2400*.

Iniciadores	Sequência de bases
<i>Sense</i>	5'- ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC - 3'
<i>Anti-sense</i>	5'- CAT CAG GAG TGG ACA GAT CC - 3'

Quadro 4. Iniciadores para reação de PCR do gene *β-globina*.

4.7 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE HPV

4.7.1 PCR com conjunto de iniciadores PGMY

Detecção de DNA do HPV foi realizada utilizando-se um conjunto de iniciadores PGMY09/11 (PGMY11 biotinilados na porção 5') (Quadro 5) (Gravitt et al., 2000) que amplificam um fragmento de 450 pb da região *L1* dos HPVs mucosos. As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo 2,5 U da enzima *Taq Platinum* DNA polimerase (Invitrogen[®], Brasil), 40 pmol de cada iniciador, 2,5 µL de tampão de reação 10X (100 mM de Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM de KCl), 30 mM de MgCl₂, 200 µM de cada desoxirribonucleotídeo, no seguinte programa de amplificação: 95°C por 5 min seguida por 40 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min e 72°C por 10 min para extensão final, utilizando termociclador *Perkin Elmer[®] GeneAmp PCR System 2400*.

Iniciador	Sequência 5'-3'
PGMY11-A:	GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG
PGMY11-B:	GCG CAG GGC CAC AAT AAT GG
PGMY11-C:	GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG
PGMY11-D:	GCC CAG GGC CAC AAC AAT GG
PGMY11-E:	GCT CAG GGT TTA AAC AAT GG
PGMY09-F:	CGT CCC AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-G:	CGA CCT AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-H:	CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-I:	G CCA AGG GGA AAC TGA TC
PGMY09-J:	CGT CCC AAA GGA TAC TGA TC
PGMY09-K:	CGT CCA AGG GGA TAC TGA TC
PGMY09-L:	CGA CCT AAA GGG AAT TGA TC
PGMY09-M:	CGA CCT AGT GGA AAT TGA TC
PGMY09-N:	CGA CCA AGG GGA TAT TGA TC
PGMY09-P:	G CCC AAC GGA AAC TGA TC
PGMY09-Q:	CGA CCC AAG GGA AAC TGG TC
PGMY09-R:	CGT CCT AAA GGA AAC TGG TC
HMB01:	GCG ACC CAA TGC AAA TTG GT

Quadro 5. Sequência (5'-3') dos iniciadores PGMY09/11 usados na PCR para detecção de HPV.
Fonte: Gravitt et al., 2000.

Como controle positivo do HPV foi utilizado DNA de HPV16 extraído de amostra clínica previamente caracterizado em nosso laboratório. Controles negativos foram utilizados em todas as reações de PCR, conforme item 4.5, assim como o procedimento descrito para observação dos produtos de amplificação em gel de agarose.

4.7.2 Teste de captura de híbridos

Foi realizado o teste de Captura Híbrida de 2ª geração para detecção de HPV de alto e baixo risco (*digene*® HC2 HPV DNA Test, QIAGEN®), conforme instruções do fabricante, e descrito a seguir: espécimes cervicais e os controles (fornecidos pelo kit) foram desnaturados com reagente de desnaturação e incubadas por 45 min a 65°C em banho-maria. Foi montada uma placa de 96 poços com 40 amostras e oito controles, para teste de LR-HPV e HR-HPV, no mesmo ensaio. Foram adicionadas as respectivas sondas de RNA com sequências específicas para cinco tipos de LR-HPV e 13 de HR-HPV em cada amostra e controles, e então a placa foi mantida sob agitação por 3 minutos (TA). Este complexo amostra-sonda (híbrido DNA-RNA) foi transferido para a placa sensibilizada com anticorpos anti-híbrido, seguindo a

mesma distribuição da placa não sensibilizada. A placa sensibilizada já preenchida com o complexo amostra-sonda foi incubada durante 1 hora a 65°C no aquecedor de microplaca (*digene*[®]). Após este período a placa foi incubada por 1 hora em temperatura ambiente, sob agitação. O sobrenadante com material não hibridizado foi desprezado e a placa foi lavada em lavadora automatizada (*digene*[®]). Foram acrescentados os Reagentes de Detecção 1, contendo anticorpos anti-híbrido conjugados à fosfatase alcalina e então o Reagente de Detecção 2 contendo peroxidase e reagente quimioluminescente. A placa foi lida automaticamente em quimioluminômetro (*digene*[®]), sendo assim obtidos os resultados para LR-HPV e HR-HPV em unidades relativas de luz (URL) para cada amostra testada. As amostras foram consideradas positivas quando o valor obtido para URL/*cutoff* foi ≥ 1 pg/mL. Estes valores foram também utilizados para estimar a carga viral, em que os resultados < 100 pg/mL, foram considerados como uma baixa carga viral, e ≥ 100 pg/mL, como alta carga viral.

4.7.3 Genotipagem de HPV

A genotipagem de HPV foi realizada com as técnicas de *Reverse Line Blot* (RLB) e *Restriction Fragment length Polymorphism* (RFLP). Ambos métodos foram aplicados nas amostras da primeira coleta e RLB foi usada para as amostras da segunda coleta. RFLP foi utilizada nas amostras de segunda coleta somente quando nenhum tipo foi detectado por RLB.

4.7.3.1 Reverse line blot

A técnica de RLB (*Reverse Line Blot*) é um tipo de hibridização reversa em linhas em que as sondas específicas estão ligadas covalentemente à uma membrana de *nylon* carregada negativamente e as amostras são dispostas em linhas verticais. A membrana validada para a detecção de 31 genótipos de HPV frequentes na região anogenital (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 66, 68, 69, 70, 73, 82, 83, 84) (Quadro 6) foi gentilmente doada pela Dr^a Maria Alejandra Picconi, chefe do Laboratório Nacional de Referência de HPV, Laboratorio Regional de Referencia HPV LabNet-OMS, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Buenos Aires-AR.

A reação foi realizada segundo Estrade et al. (2011), com algumas modificações (WHO, 2010) com produtos de amplificação biotinilados obtidos com iniciadores PGMY09/11, com cada PGMY11 biotinilado na porção 5', como descrita a seguir: foram adicionados a 10 µL do produto biotinilado 150 µL do tampão 2x SSPE - 0,1% SDS (SSPE 20x, pH7,4; NaCl 3M, NaPO₄ 0,2M, EDTA 0,02M) e incubados a 96°C por 10 min para desnaturação do DNA; a membrana, contendo sondas para 31 genótipos de HPV, foi lavada com 150 mL de 2x SSPE – 0,1% SDS por 5 minutos à temperatura ambiente e colocada no *blotter* (GE, AmershamTM). Foram aplicados 140 µL do produto diluído no *blotter* com a membrana posicionada de forma que as sondas ficassem localizadas transversalmente; sendo incubados em forno de hibridização a 51°C por 60 min. Após esse tempo, as amostras foram aspiradas a vácuo e a membrana lavada por 20 min com tampão 2x SSPE - 0,5% SDS a 51°C. A membrana foi então incubada com conjugado (estreptavidina-peroxidase 1: 4000) em tampão 2x SSPE – 0,5% SDS em garrafa de rotação por 60 min a 42°C, em forno de hibridização e, então lavada a 42°C com 150 mL de tampão 2x SSPE - 0,5% SDS por 20 min, com agitação, seguida por lavagem com tampão 2x SSPE por 10 min à temperatura ambiente. Foram adicionados à membrana 5 mL de Reagentes de Detecção 1 e 2 (ECL, AmershamTM) que, após incubação por um minuto, foi colocada entre duas folhas de acetato transparente dentro de um cassete radiográfico. Uma película radiográfica foi disposta sobre o acetato, para exposição durante 15 minutos; a placa foi revelada com reagentes radiográficos (revelador e fixador, Kodak), procedendo-se à análise dos resultados.

Tipos de HPV	Sequências (5'-3')
HPV06_P	TGGAAGATGTAGTTACGGATG
HPV11_P	GCAGATTTAGACACAGATGCA
HPV16_P	GATATGGCAGCACATAATGAC
HPV18_P	CCAGGTACAGGAGACTGTGTA
HPV26_P	TACGCTGACAGGTAGTAGCAG
HPV31_P	AGTATCACTGTTTCGAATTGC
HPV33_P	TGTCACTAGTTACTTGTGTGC
HPV34_P	GCAGTTGTA CT TGTGGATTGT
HPV35_P	AGAAGACACAGCAGAACACAC
HPV39_P	GTAGAAGGTATGGAAGACTCT
HPV40_P	ATAGCCTTGTTGGTAAGGAAC
HPV42_P	TGTATCACCAGATGTTGCAGT
HPV44_P	TAGTATATGTAGACGGAGGGG
HPV45_P	GTA CT TGGCACAGGATTTTGT
HPV51_P	T TACTTGGAGTAAATGTTGGG
HPV52_P	C T T T C C T T T A G G T G G T G T G T T
HPV53_P	AGACATAGACTGTGTGGTTGC
HPV54_P	T T A T T A A A G C T A T C C T G C G T G
HPV55_P	GATGGAGACTGAGTTGTAGCA
HPV56_P	T T T C G T G C A T C A T A T T T A C T T
HPV57b_P	T T C T G T G T T T A C A G T G G C A C A
HPV58_P	C T T C C T T A G T T A C T T C A G T G C
HPV59a_P	AGTAGAGCACACACAGAAAGA
HPV59b_P	AGTAGAAGCACACACAGAAAG
HPV66_P	AGTTAATGTGCTTTTAGCTGC
HPV68_P	CTGATTGCAGATAGCGGTATG
HPV69_P	G T T T A A A A G T G G C A G A T G C A G
HPV70_P	CTATATACAGCAGGTATGGCC
HPV 73_P	GGCATACGTTGTAGTAGAGCT
HPV 82_P	TGCAACAGATTGAGTAACAGC
HPV 83_P	AGAGGCTGTGTATTCATTAGC
HPV 84_P	ATTCTGATTCGGTGTGGTAG

Quadro 6. Sondas para Hibridização Reversa em Linhas. (WHO, 2010)

4.7.3.2 Restriction Fragment Length Polymorphism

A técnica de RFLP foi realizada conforme previamente descrito, com algumas modificações (Bernard et al., 1994). Aproximadamente 1 ng de produto de PCR foi digerido com 10 unidades de cada enzima de restrição *Bam*HI, *Ddel*, *Hae*III, *Hin*fl, *Pst*I, *Rsa*I, *Sau*3AI (Promega®, Madison WI), em tampão de digestão (1M NaCl; 100mM MgCl₂; 100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM β-mercaptoetanol) e incubados à 37°C, por 12 horas. Os produtos de digestão enzimática obtidos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 3%, corados com EtBr e visualizados sob luz UV. O padrão de digestão obtido foi analisado e comparado ao descrito na literatura (Bernard et al., 1994) e o tipo de HPV foi identificado. Tipos não identificados neste padrão foram classificados como tipo indeterminado ou HPV-X.

4.7.4 Análise de variantes

Todas as amostras positivas para HPV16, tanto por RFLP quanto por RLB, foram levadas para o laboratório coordenado pelo Dr. Robert D. Burk (*Albert Einstein College of Medicine, New York, USA*) para identificação das variantes filogenéticas do HPV16. Esta parceria entre o laboratório de Virologia NDI-UFES e o laboratório de Dr Burk foi realizada em decorrência do doutorado sanduíche (PDSE-CAPES) no segundo semestre de 2012.

A análise de variantes foi realizada pela identificação de alterações nucleotídicas, inserções e/ou deleções (indels), no genoma completo. Amplificação do genoma completo foi realizada utilizando-se 3 pares de iniciadores em reações de PCR e nPCR. Nas duas reações foram utilizados uma mistura com quantidade igual das enzimas *AmpliTaq Gold DNA polimerase* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) e *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen®, Carlsbad, CA). O produto de amplificação foi resolvido em gel de agarose 1%, corado com EtBr e observado sob luz UV. As amostras que se apresentaram positivas na PCR e/ou nPCR foram purificadas utilizando-se *QuickStep 2 PCR Purification kit* (Edge BioSystems, Gaithersburg, MD) diretamente do tubo de PCR, quando a amostra apresentou bandas inespecíficas o DNA específico foi purificado do gel com *QIAquick Gel PCR Purification Kit* (QIAGEN®, Valencia CA). As amostras foram submetidas ao sequenciamento gênico, com 20 iniciadores, separadamente, utilizando o kit *Big Dye Terminator v3.1* (Applied Biosystems®) no sequenciador automatizado *ABI Prism 377* (*Einstein DNA Sequencing Core Facility*). As sequências obtidas foram editadas utilizando-se *software* *Geneious v6.1.6* (Rozen & Skaletsky, 2000), e então alinhadas com as sequências-referência de HPV16 para cada sublinhagem (Quadro 7), utilizando o programa *MAFFT v6.903b* (Kato & Toh, 2010). A construção da árvore filogenética de todas as sequências alinhadas foi realizado pelo software *PhyML* (Guindon & Gascuel, 2003).

Tipo	Linhagem	Sublinhagem	Variante	Nº acesso GenBank	Outros nomes
HPV16	A	A1	Ref	K02718	Europeia (E)
		A2	W0122	AF536179	E
		A3	AS411	HQ644236	E
		A4	W0724	AF534061	Asiática, E(As)
	B	B1	W0236	AF536180	Africana-1, Afr1a
		B2	Z109	HQ644298	Africana-1, Afr1b
	C		R460	AF472509	Africana-2, Afr2a
	D	D1	QV00512	HQ644257	Norte Americana (NA)1
		D2	QV15321	AY686579	Asiático-Americana (AA)2
		D3	QV00995	AF402678	Asiático-Americana (AA)1

Quadro 7. Sequências usadas como referência para alinhamento e análise filogenética de HPV16.

4.8 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AAV

4.8.1 Detecção de genoma do AAV

Para a detecção de DNA do AAV foram utilizados os iniciadores para região comum aos tipos AAV2, 3 e 5: Pan1/Pan3 e Nest1/Nest2 na PCR e na nPCR, respectivamente (Tobiasch et al., 1994).

A região amplificada do genoma do AAV corresponde ao gene *rep*, localizada entre os promotores p19 e p40. As sequências e as posições relativas dos iniciadores utilizados na detecção e na discriminação de AAV5, descrito posteriormente (sub-item 4.8.2.1), podem ser observadas na representação esquemática do genoma do AAV (Figura 13).

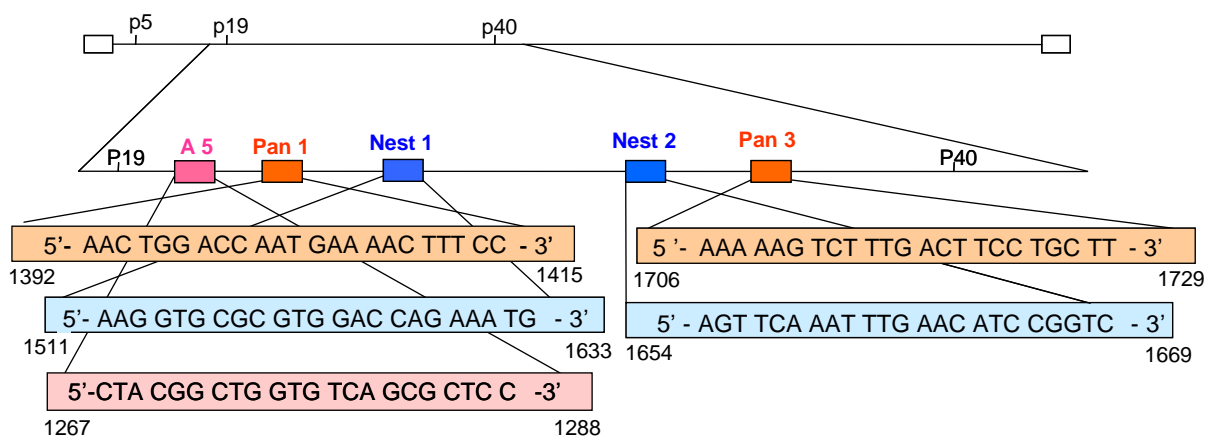


Figura 13. Genoma do AAV e iniciadores. Representação esquemática do genoma do AAV demonstrando a localização relativa dos iniciadores A5, Pan1, Pan3, Nest1 e Nest2 e suas respectivas sequências. Fonte: Tobiasch et al. (1998), adaptado.

A amplificação do DNA do AAV foi realizada conforme previamente descrito (Tobiash et al., 1994). As concentrações e o programa de amplificação estão descritos nos Quadros 8 e 9.

As reações de nPCR para AAV2, 3 e 5 foram realizadas com 10 µL do produto da PCR, em um volume final de 50 µL contendo as mesmas concentrações dos reagentes utilizados na amplificação por PCR (Quadro 8). O programa de amplificação da nPCR pode ser observado no Quadro 9.

Como controle positivo para a reação de amplificação do AAV foi utilizado o plasmídeo pTAV2, que contém como inserto o genoma completo do AAV2, gentilmente fornecido por Dr. Jörg R Schlehofer (Laboratório de Virologia, Heidelberg, Alemanha). Controles negativos foram utilizados em todas as reações de PCR e nPCR, conforme item 4.6, assim como o procedimento descrito para observação dos produtos de amplificação em gel de agarose.

4.8.2 Genotipagem de AAV

Como a metodologia utilizada para detecção de AAV, descrita anteriormente, não discrimina entre os tipos 2, 3 e 5, mais comuns na região genital, foram realizados dois procedimentos para a determinação do tipo de AAV detectado, descritos a seguir.

4.8.2.1 PCR e nPCR

AAV5 foi discriminado dos casos positivos para AAV por PCR e nPCR com iniciadores específicos: A5/Pan3 e A5/Nest2, respectivamente (Tobiasch et al., 1994) (Figura 13). As reações foram realizadas nas mesmas condições da detecção de AAV descrita anteriormente (item 4.8.1). As concentrações e o programa de amplificação estão descritos nos Quadros 8 e 9. Amostra positiva para o tipo 5 de AAV, amplificada por nPCR em pesquisa anterior, foi utilizada como controle positivo do AAV5 (Freitas et al., 2009). Controles negativos foram utilizados em todas as reações de PCR e nPCR, conforme item 4.6, assim como o procedimento descrito para observação dos produtos de amplificação em gel de agarose.

Reagentes da mistura para PCR	Concentração / volume (50 μ L reação)		
	β -globina	AAV	HPV
dXTP	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
Tampão de reação (10X)	5 μ L	5 μ L	5 μ L
MgCl ₂ 50mM	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM
Iniciadores	0,32 μ M	0,32 μ M	40 pmol
	0,32 μ M	0,32 μ M	40 pmol
Taq polimerase	0,05 uds	0,05 uds	0,1 uds
DNA (amostra)	4 μ L	10 μ L	10 μ L

Quadro 8. Mistura para PCR para o gene β -globina, AAV e HPV.

Fase do programa		Descrição do programa							
		β -globina		AAV (2, 3, 5)		AAV5		HPV (40 ciclos)	
		Tempo	°C	Tempo	°C	Tempo	°C	Tempo	°C
Desnaturação inicial		2 min	94	2 min	94	2 min	94	5 min	94
35 ciclos	Desnaturação	20 s	94	1 min	94	1 min	94	1 min	94
	Anelamento	30 s	50	3 min	62	30 s	55	1 min	55
	Extensão	30 s	72	1 min	72	45 s	72	1 min	72
Extensão final		10 min	72	10 min	72	10 min	72	10 min	72

Quadro 9. Programas de amplificação para o gene β -globina, AAV (2, 3 e 5), AAV5 e HPV.

4.8.2.2 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

RFLP foi realizada a fim de discriminar os tipos AAV2, 3 e 5, nas amostras positivas para AAV, conforme previamente descrito (Freitas, 2009) com as enzimas *HaeIII* e *Sau3AI* (Quadro 10).

As reações de digestão foram realizadas com aproximadamente 3 μ g de DNA proveniente dos *amplicons* das amostras positivas para AAV na nPCR (158 pb) em 10 μ L de tampão de digestão (100 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM β -mercaptoetanol) com 5 uds de cada enzima de restrição, com incubação a 37°C durante 12 horas. A reação foi observada, sob luz UV, após eletroforese em gel de agarose a 3%, corado com EtBr a 5 μ g/mL.

Tipo AAV	Fragmento obtido após digestão enzimática	
	<i>HaeIII</i>	<i>Sau3AI</i>
AAV2	123 pb 35 pb	158 pb
AAV3	158 pb	104 pb 36 pb 18 pb
AAV5	158 pb	158 pb

Quadro 10. Determinação do tipo de AAV por RFLP, conforme padrão de digestão com enzimas de restrição.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados das pacientes foram armazenados de forma anônima num banco de dados criado no programa SPSS – data entry (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 17. Foram realizadas análises de frequência para as variáveis categóricas e cálculo de média e desvio-padrão para variáveis contínuas. As taxas foram calculadas para a frequência dos dados acumulados. As associações com as variáveis demográficas foram inicialmente testadas por meio de testes de qui-quadrado, com correção de Yates ou teste de Fisher, quando apropriado. A incidência acumulada e a resolução da infecção pelo HPV foram calculadas considerando o número de casos novos e suas proporções. Análise multivariada de regressão logística multinomial foi utilizada para estimar o efeito da infecção mista AAV-HPV.

O diagnóstico do AAV e da presença de infecção mista foram realizados sem o prévio conhecimento dos resultados para HPV ou de citologia.

O grau de concordância das técnicas de detecção de HPV foi avaliado calculando-se o coeficiente *kappa*.

4.10 DEFINIÇÃO DE PERSISTÊNCIA DA INFECÇÃO E PROGRESSÃO DA LESÃO

Em relação à persistência da infecção, ou seja, presença ou ausência de DNA do vírus nos dois momentos de coleta, realizou-se a seguinte classificação: i) infecção persistente, quando foi positiva nas duas coletas; ii) infecção resolvida, positiva na 1ª coleta e negativa na 2ª; iii) nova infecção, quando negativa na 1ª coleta e positiva na

2ª; iv) negativa, quando foi negativa nas duas coletas (Quadro 11) (Sammarco et al., 2013).

A partir dos dados citológicos encontrados nas duas coletas, o desfecho da lesão foi classificado como: (i) regressão, quando houve diminuição do grau da lesão; (ii) progressão, quando houve aumento do grau da lesão; (iii) persistência, quando o grau da lesão se manteve nos dois momentos e; (iv) normal, quando a citologia foi normal em ambas as coletas. Segue exemplo no Quadro 12.

Classificação da infecção	1ª coleta	2ª coleta
Infecção persistente	+	+
Infecção resolvida	+	-
Nova infecção	-	+
Negativa	-	-

Quadro 11. Definição do desfecho da infecção.

Citologia / biópsia		Desfecho
1ª coleta	2ª coleta	
NIC3	NIC1	Regressão
NIC2	<i>Ca in situ</i>	Progressão
NIC1	NIC1	Persistência
Normal	Normal	Normal

Quadro 12. Exemplo de definição de desfecho da lesão.

5 RESULTADOS

5.1 AMOSTRAS

No período de abril de 2010 a outubro de 2011 foram coletadas 281 amostras cervicais de mulheres que aceitaram participar da pesquisa, denominadas em todo o texto como “amostras de 1ª coleta”. As amostras de seguimento, ou seja, das mulheres que voltaram para uma nova coleta um ano após a primeira visita, estão denominadas como “amostras de 2ª coleta”. Das 281 pacientes convidadas a realizar o acompanhamento no ambulatório, 156 retornaram, das quais foram obtidas as amostras de 2ª coleta. Os resultados serão apresentados para os dois momentos de coleta separadamente, enquanto que para a análise de coorte, serão utilizadas apenas as amostras que tiveram as duas coletas realizadas. O estudo de corte transversal realizado no primeiro momento, em relação ao HPV está descrito no Apêndice A (Boldrini et al., 2014).

5.2 DADOS SÓCIO-DEMOGRÁFICOS, COMPORTAMENTAIS E CLÍNICOS

A partir de questionário estruturado (Anexo 1) foram obtidos os dados sócio-demográficos, comportamentais e clínicos da população de estudo, previamente apresentados (Boldrini et al., 2014; Apêndice A). Estes dados estarão apresentados em relação a prevalência de AAV no item 5.8.

5.3 CITOLOGIA

Os resultados dos exames citopatológicos dos espécimes cervicais obtidos na primeira e segunda coletas foram divididos em três grupos, conforme aspecto celular observado (Tabela 1). O desfecho da lesão, a partir dos resultados citopatológicos de 1ª e 2ª coletas, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 1. Distribuição das amostras em relação ao exame citopatológico nas amostras de 1ª coleta e 2ª coleta.

Grupo citológico	Alterações celulares	Amostras 1ª coleta (n=281)	Amostras 2ª coleta (n=156)
Grupo 1	- sem alteração - com alterações celulares benignas incluindo inflamação	161 (57,3%)	76 (48,7%)
Grupo 2	- LSIL, compreendendo aquelas com efeito citopático pelo HPV, - NIC I - ASC-US; ASC-H, AGC	65 (23,1%)	18 (11,5%)
Grupo 3	- HSIL - NIC II - NIC III	55 (19,6%)	11 (7%)
Sem resultado	-	-	51 (32,7%)

LSIL: lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL: lesão intraepitelial de alto grau; NIC: neoplasia intraepitelial de grau 1 (NIC I), grau 2 (NIC II) e grau 3 (NIC III); ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado; ASC-H: células escamosas atípicas, em que não se pode afastar lesão de alto grau; AGC: atipia de células glandulares.

Tabela 2. Desfecho da lesão, baseada nos resultados de 1ª coleta e 2ª coleta.

Citologia 1ª coleta	Desfecho Citologia					Total
	Normal	Regressão	Persistência	Progressão	Sem result.	
Grupo 1	36	0	0	10	40	86
Grupo 2	0	23	6	2	6	37
Grupo 3	0	22	2	4	5	33
Total	36	45	8	16	51	156

5.4 AMPLIFICAÇÃO DO GENE β -GLOBINA

Amplificação do gene β -globina foi realizada como controle de extração do ácido nucleico apenas nos casos negativos na PCR de HPV, sendo positiva em todas as amostras (Figura 14).

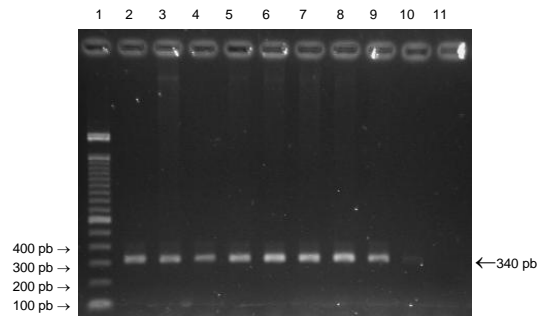


Figura 14. Produto de amplificação do gene β -globina. Eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com EtBr, do produto de amplificação de 340 pb do gene β -globina, utilizando iniciadores 9/22 e 13/22. Col 1: padrão de peso molecular (100 pb); Col 2-9: amostras positivas; Col 10: amostra fracamente positiva; Col 11: controle negativo (extração de água).

5.5 DETECÇÃO DE DNA DO HPV

DNA do HPV foi detectado em 55,8% (157/281, Figura 15) das amostras de secreção cervical de 1ª coleta, por PCR e Captura Híbrida (Boldrini et al., 2014; Apêndice A). O resultado de detecção do HPV na 1ª coleta será considerado, neste estudo, apenas em relação à prevalência de AAV (item 5.8) e em comparação ao resultado das amostras de 2ª coleta. A análise de prevalência do HPV bem como sua relação com o perfil comportamental das mulheres participantes da pesquisa foram apresentadas previamente ((Boldrini et al., 2014; Apêndice A). Nas amostras de 2ª coleta (n=156) foram detectados DNA de HPV em 57 amostras (36,5%) (Tabela 3).

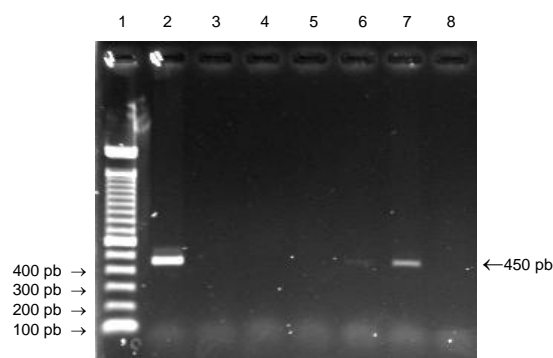


Figura 15. Produto de PCR para HPV. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com EtBr, do produto de amplificação de 450 pb do DNA do HPV através de PCR, utilizando os iniciadores PGMY09 e PGMY11. Col 1: padrão de peso molecular (100 pb); Cols 2, 6 e 7: amostras positivas para HPV; Cols 3, 4 e 5: amostras negativas; Col 8: controle negativo de reação.

Tabela 3. Detecção de HPV em ambas as coletas.

Detecção HPV		2ª coleta			Total
		+	-	NR	
1ª coleta	+	44	50	63	157
	-	13	49	62	124
Total		57	99	125	281

NR: 2ª coleta não foi realizada.

Como foram utilizados dois métodos de detecção molecular para HPV nas amostras de 1ª coleta, os resultados de ambos os testes foram comparados, sendo coincidentes em 70% dos casos (110/157), com índice de concordância *kappa* de 0,66, considerado bom (Tabela 4).

Tabela 4. Comparação dos resultados obtidos para a frequência de HPV pelas técnicas de PCR e captura de híbridos.

PCR	Captura híbrida (%)		TOTAL	<i>kappa</i>
	+	-		
+	110 (39,1)	32 (11,4)	142	0,66
-	15 (5,3)	124 (44,1)	139	
TOTAL	125	156	281	

Considerando os casos positivos para HPV divididos nos grupos de baixa (<100 pg/mL) e alta (\geq 100 pg/mL) carga viral, os da classe LR-HPV foram detectados em sua maioria com baixa carga viral (Tabela 5), e ainda observou-se que a persistência ou progressão da lesão não diferiram em relação à carga viral; mas 63% dos casos que permaneceram sem ou com regressão da lesão ocorreram nos de baixa carga viral (Tabela 6).

Tabela 5. Valores de URL obtidos das amostras positivas na captura híbrida.

Classe HPV	URL (pg/mL)	
	<100	\geq 100
LR	24 (80%)	6 (20%)
HR	64 (57%)	48 (43%)

LR: HPV de baixo risco (low risk); HR: HPV de alto risco (high risk).

Tabela 6. Valores de URL obtidos das amostras positivas na captura híbrida para HR-HPV e relação com desfecho da citologia.

URL HR-HPV	Desfecho da citologia		
	Normal + Regressão	Persistência + Progressão	s/ result.
<100	26 (63%)	08 (47%)	30
≥100	15 (37%)	09 (53%)	24
Total*	41	17	54

* Quatro amostras sem o valor de URL.

5.6 GENOTIPAGEM DE HPV

Considerando os resultados de RFLP e RLB do total de amostras positivas para HPV na 1ª coleta (n=157), foram identificados 32 tipos, sendo 13 casos não tipados ou HPV-X (Gráfico 1) (Boldrini et al., 2014; Apêndice A). Classificação em risco determinou 90,3% (130/144) como HR-HPV e 9,7% (14/144) como LR-HPV.

Comparando-se as duas metodologias utilizadas nas amostras de 1ª coleta, RFLP identificou sete tipos não identificados na RLB, enquanto a RLB identificou 4 tipos não identificados pela RFLP. O método de RFLP possibilita a identificação ilimitada, ou seja dos tipos de HPV mucosos descritos e ainda de novos tipos de HPV (Figura 16). Entretanto, existe uma limitação visual na distinção dos fragmentos no caso de infecções mistas e ainda a quantidade de DNA pode limitar a visualização dos fragmentos. Já a determinação de infecções mistas na RLB é facilitada, uma vez que a identificação dos tipos não se sobrepõem (Figura 17), portanto infecção mista com até 3 tipos foi identificada por RFLP, enquanto amostras com até 5 tipos foram identificadas por RLB. Os tipos foram coincidentes em 59% dos casos, sendo que em 30% destes, a RLB identificou outros tipos, além dos coincidentes.

Do total de casos positivos para HPV nas amostras de 2ª coleta (57/156), 48 amostras tiveram seus tipos determinados, com 28 diferentes genótipos, sendo 91,7% (44/48) HR-HPV e 8,3% (4/48) LR-HPV. Em nove amostras o tipo de HPV não pôde ser determinado, portanto 15% das amostras foi classificado como HPV-X (Gráfico 1). Os tipos de HPV presentes nas duas coletas e sua relação com a citologia estão demonstrados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

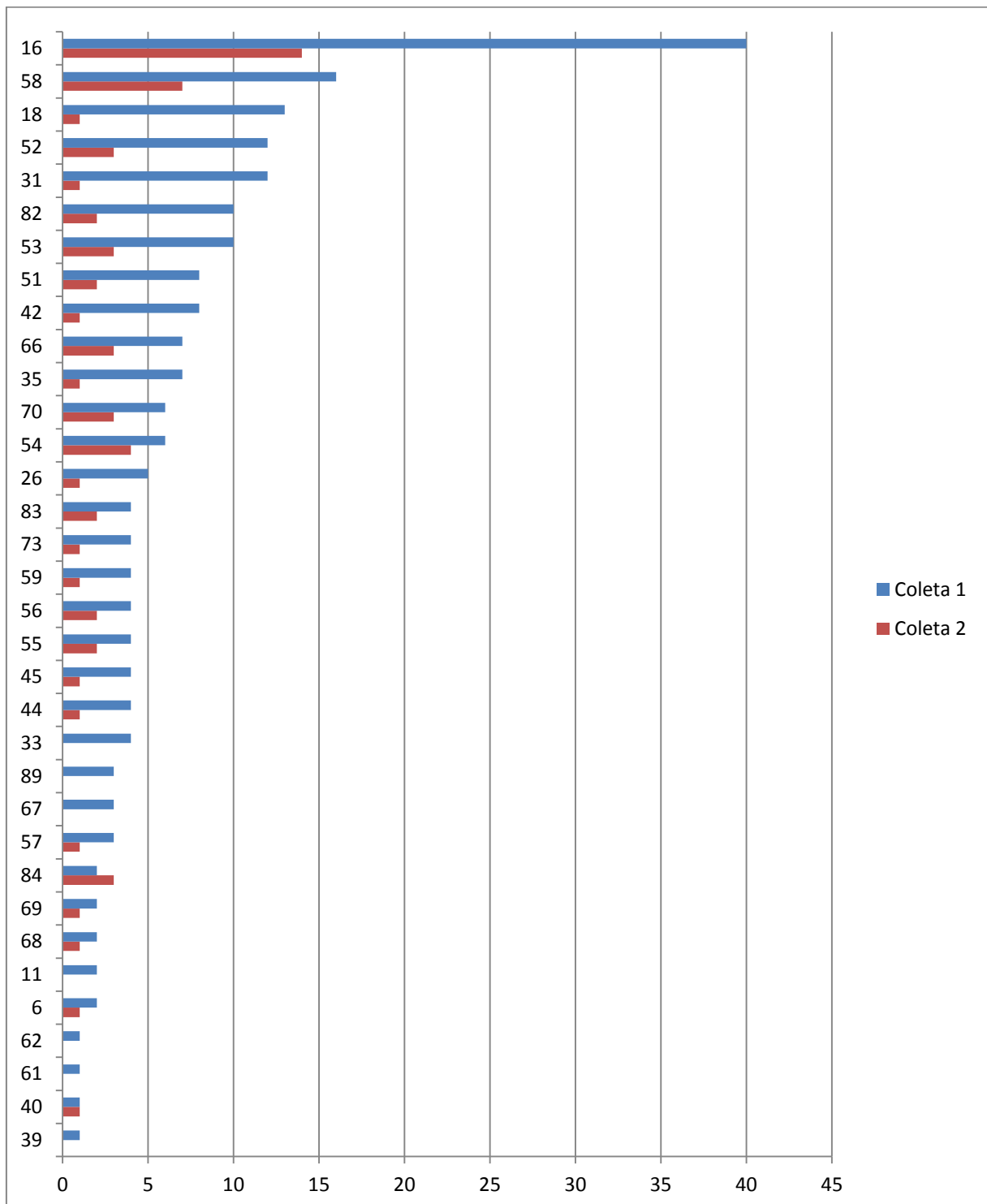


Gráfico 1. Prevalência dos tipos de HPV identificados na 1ª (157/281) e 2ª coletas (57/156). No eixo X observa-se a frequência de casos positivos para cada tipo de HPV, no eixo Y, os tipos de HPV identificados.

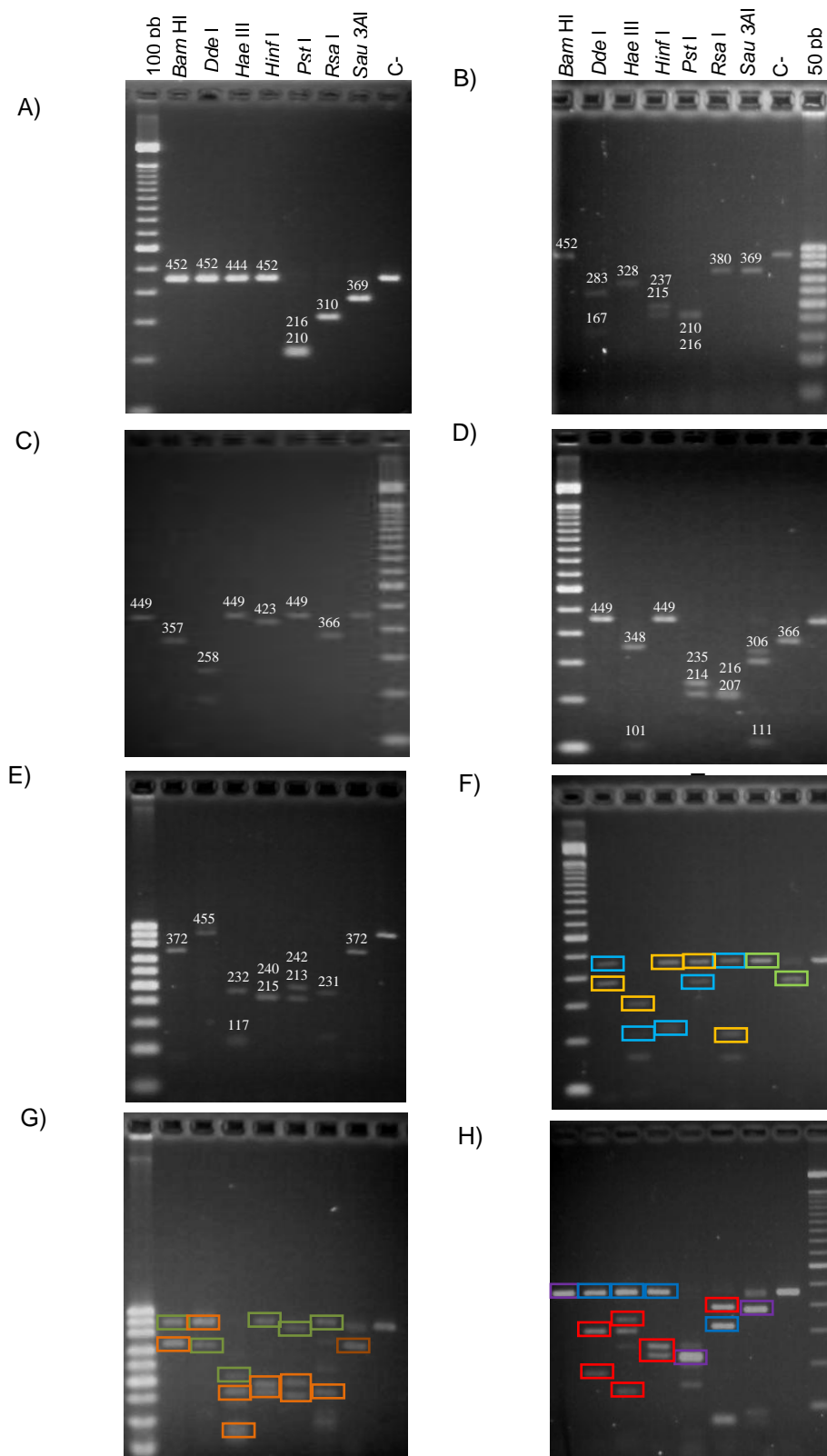


Figura 16. Produto de digestão específico para tipos mucosos de HPV com enzimas *Bam*HI, *Dde*I, *Ha*eIII, *Hin*fI, *Pst*I, *Rsa*I, *Sau*3AI. Em infecção simples: A) HPV16; B) HPV31; C) HPV52; D) HPV58; E) HPV70; em coinfeção: F) HPV53 (azul e verde) + HPV 66 (amarelo e verde); G) HPV52 (verde e marrom) + HPV70 (laranja e marrom); H) HPV16 (azul e roxo) + HPV31 (vermelho e roxo). Cada coluna indica o produto de digestão do amplicon de 450 pb com a respectiva enzima indicada. C-: amplicon sem adição de enzima de restrição. Amostras A, C, D, F e H (peso molecular de 100pb) e B, E e G (peso molecular de 50pb).

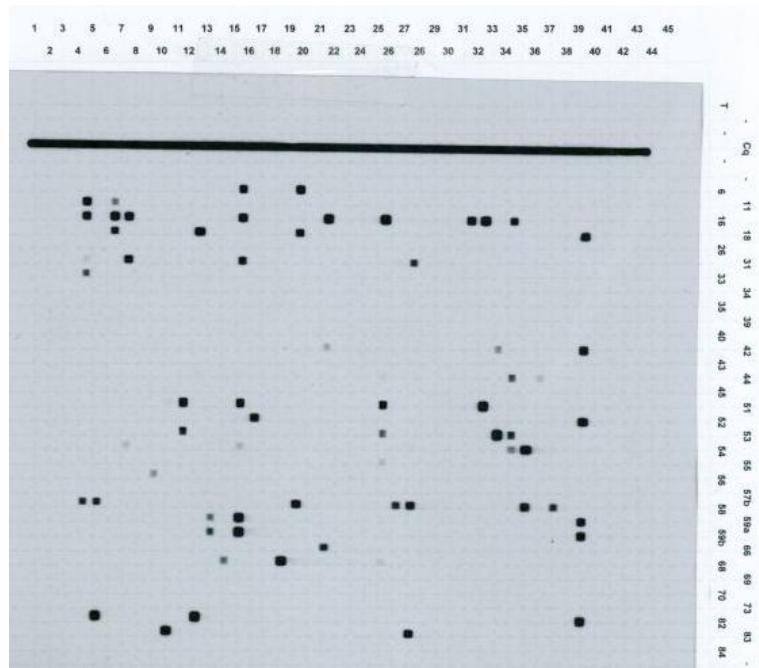


Figura 17. Filme radiográfico revelado após de reação de hibridização em linhas (RLB) para genotipagem de HPV. Linhas verticais indicam as amostras e as horizontais os tipos de HPV pesquisados (esquerda). Ex: amostra número 40 apresenta genótipos 18, 42, 52, 59, 82

Tabela 7. Classificação em risco dos tipos de HPV identificados na 1ª e 2ª coleta.

HPV	1ª coleta	2ª coleta	Casos novos
LR-HPV	14 (9%)	04 (7%)	2 (10%)
HR-HPV	130 (83%)	44 (77%)	
HPV16	46 (35%)	14 (32%)	7 (37%)
outros	80 (65%)	30 (68%)	10 (53%)
HPV-X	13 (8%)	09 (16%)	0
HPV total*	157	57	19

* Os valores não equivalem ao total, devido aos casos de infecção mista

LR-HPV: HPV de baixo risco; HR-HPV: HPV de alto risco; HPV-X: tipo não determinado

Tabela 8. Classificação em risco dos tipos de HPV identificados nas duas coletas do estudo em relação à citologia.

Citologia*	HPV					
	1ª coleta			2ª coleta		
	HR	LR	X	HR	LR	X
Grupo 1	45	10	11	22	3	2
Grupo 2	35	4	2	8	0	0
Grupo 3	50	0	0	7	1	0
Sem resultado	-	-	-	7	0	7
Total	130	14	13	44	4	9

* Grupo 1: amostras com citologia normal, alterações inflamatórias brandas;

Grupo 2: amostras com lesões de baixo grau como NIC1, LSIL, ASCUS, AGUS;

Grupo 3: amostras com lesões de alto grau, NIC2/3, carcinoma in situ/invasivo.

LR: HPV de baixo risco; HR: HPV de alto risco

5.7 ANÁLISE DE VARIANTES DE HPV16

O estudo da análise de variantes de HPV16 foi aceito para publicação na revista PlosOne (Freitas et al., 2014; Apêndice B), e será brevemente apresentado a seguir com informações complementares.

Todas as 46 amostras de HPV16 (1ª coleta) foram submetidas à amplificação do genoma completo e destas, o produto completo foi obtido de 32 e parcial de seis. Todas as sequências nucleotídicas, completas e parciais, foram comparadas com sequências protótipo de cada linhagem/sublinhagem de variantes de HPV16. Análise filogenética classificou 65,8% (n=25) das amostras como variante europeia (linhagem A) e 34,2% (n=13), como não-europeia (linhagens B, C e D).

Em relação à citologia foi demonstrado um risco de 4,6 vezes (OR 4,66; IC 1,07-20,2) de desenvolvimento de lesão de alto grau nas amostras em que foram identificadas as variantes NE (não-europeias) (Tabela 9).

Foram identificadas 393 alterações nucleotídicas pontuais em todas as amostras sequenciadas, completa ou parcialmente (dados não mostrados). Algumas destas substituições podem ser resultado de erro na incorporação dos nucleotídeos durante amplificação, portanto apenas as substituições que ocorreram em pelo menos três amostras estão demonstradas no Apêndice C. Estas alterações ocorreram em 170 posições, sendo 41 delas em região não codificadora (NCR2/URR). Dentre as alterações ocorridas nas ORFs, 73 foram sinônimas, mais frequente em *L1*, *E4* e *E7*, as 56 não-sinônimas foram encontradas mais frequentemente em *E2*, *E5* e *E6* (Tabela 10, Apêndice C).

Tabela 9. Distribuição das variantes de HPV16 em relação ao diagnóstico citológico.

Citologia	HPV16		Total
	E	NE	
< NIC3	20	06	26
NIC3 +	05	07	12
Total	25	13	38

< NIC3: grupo controle (citologia normal e NIC1 e 2); NIC3 +: grupo caso (NIC3 ou Ca in situ ou invasor); E: variante europeia de HPV16; NE: variante não-europeia de HPV16.

Tabela 10. Relação das alterações nucleotídicas e sua localização gênica.

Região do genoma*	Alterações nucleotídicas		
	Total	Sinônima	Não-sinônima
E6	9	4	5
E7	4	3	1
E1	29	22	10
E2	23	7	16
E4	9	6	3
E5	7	3	4
L2	31	19	12
L1	18	13	5
NCR2	20	-	-
LCR	21	-	-
Total	170	73	56

* Região no genoma do HPV: E, região precoce; L, região tardia; NCR2, região não-codificadora 2; LCR: região longa de controle.

5.8 DETECÇÃO E TIPAGEM DE AAV

As reações de nPCR revelaram 30% (84/281) das amostras de 1ª coleta positivas para o AAV e 27% (42/156) positivas a partir do total de amostras obtidas na 2ª coleta (Figura 18, Tabela 11). Um ano após o primeiro resultado de infecção por AAV, 10% (16/156) das infecções persistiram, enquanto 23% (36/156) se resolveram. Já entre casos negativos para a infecção de AAV no primeiro momento, 17% (26/156) apresentaram infecção na 2ª coleta, enquanto 50% (78/156) permaneceram negativas. Na Tabela 12 pode ser observada a relação do desfecho da infecção por AAV com o desfecho da citologia.

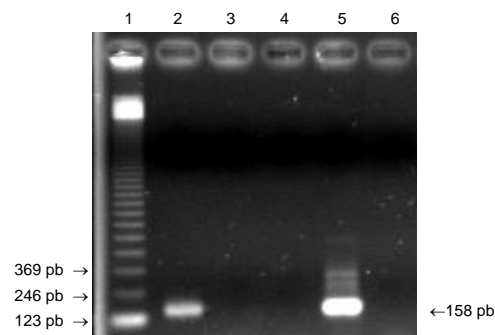


Figura 18. Produto de amplificação por nPCR para AAV2, 3 e 5 das amostras clínicas. Amplicon de 158 pb do DNA do AAV através de nPCR, utilizando os iniciadores Nest1 e Nest2. Col 1: padrão de peso molecular (123 pb); Cols 2 e 5: amostras positivas; Cols 3 e 4: amostras negativas; Col 6: controle negativo de reação.

Tabela 11. Resultados para AAV em relação à citologia nos dois momentos de coleta. Resultados de AAV de 2ª coleta relativos aos resultados de citologia de 2ª coleta.

Citologia*	AAV n (%)			
	1ª coleta		2ª coleta	
	+	-	+	-
Grupo 1	47 (56)	113 (57)	22 (52)	54 (47)
Grupo 2	18 (21)	47 (24)	08 (19)	10 (09)
Grupo 3	19 (23)	37 (19)	02 (05)	09 (08)
Sem result	-	-	10 (24)	41 (36)
Total	84 (30)	197 (70)	42 (27)	114 (73)

*Grupo 1: amostras com citologia normal, alterações inflamatórias brandas;
 Grupo 2: amostras com lesões de baixo grau como NIC1, LSIL, ASCUS, AGUS;
 Grupo 3: amostras com lesões de alto grau, NIC2/3, carcinoma in situ/invasivo.

Tabela 12. Desfecho da infecção por AAV em relação ao desfecho da citologia.

Desfecho da citologia*	Desfecho da infecção por AAV**				Total
	Negativa	Resolução	Nova Infecção	Persistência	
Normal	13	10	10	3	36
Regressão	19	14	5	7	45
Persistência	4	2	1	1	8
Progressão	9	2	3	2	16
s/ resultado	33	8	7	3	51
Total	78	36	26	16	156

*Normal, quando a citologia foi normal em ambas as coletas; Regressão, quando houve diminuição do grau da lesão; Persistência, quando o grau da lesão se manteve nos dois momentos; Progressão, quando houve aumento do grau da lesão; S/ resultado, quando não foi obtido o resultado das amostras de 2ª coleta.

** Negativa, negativa nas duas coletas; Resolução, amostra positiva na 1ª coleta e negativa na 2ª; nova infecção, quando negativa na 1ª coleta e positiva na 2ª; Persistência, quando infecção foi positiva nas duas coletas.

A frequência de AAV foi analisada em relação aos dados obtidos no questionário, sendo que apenas idade maior de 15 anos na 1ª gestação esteve significativamente relacionada (Tabelas 13, 14 e 15).

Tabela 13. Dados demográficos das pacientes atendidas no ambulatório de patologia do HUCAM de acordo com a frequência de AAV (n=281).

Variáveis	AAV n (%)		Valor p
	+	-	
Idade (anos)			0,10
19-29	27 (32)	43 (22)	
30-49	43 (51)	104 (53)	
≥ 50	14 (17)	50 (25)	
Escolaridade (anos)			0,63
0-4	25 (30)	45 (23)	
5-8	22 (26)	52 (26)	
≥ 9	37 (44)	100 (51)	
Estado marital			0,85
Solteira	20 (24)	41 (21)	
Casada	50 (60)	122 (62)	
Separada/viúva	14 (16)	34 (17)	
Renda familiar			1,00
Até 3 SM*	59 (70)	139 (70)	
Mais 3 SM	25 (30)	58 (30)	

* SM= salário mínimo brasileiro em 2011 (R\$545,00)

Tabela 14. Dados comportamentais da população estudada.

Variáveis	AAV n (%)		Valor p
	+	-	
Tabagismo			
Sim	31 (37)	73 (37)	1,00
Não	53 (63)	124 (63)	
Uso drogas ilícitas			
Sim	1 (1,2)	10 (5)	0,18
Não	83 (98,8)	187 (95)	
Idade 1º coito			
<15 anos	13 (16)	21 (11)	0,31
≥15 anos	71 (84)	175 (89)	
Nº parceiros / vida			
Mais 1 parceiro	65 (77)	149 (76)	0,88
1 parceiro	19 (23)	48 (24)	
Nº parceiros/último ano			
Mais 1 parceiro	9 (11)	11 (5,6)	0,13
1 parceiro	75 (89)	186 (94,4)	
Uso de preservativos			
Sim	18 (21)	48 (24)	0,64
Não	66 (79)	149 (76)	
Prática de coito anal			
Sim	26 (31)	61 (31)	1,00
Não	58 (69)	136 (69)	
História de DST			
Sim	17 (25)	26 (13)	0,14
Não	67 (75)	171 (87)	

Tabela 15. Dados clínicos da população estudada.

Variáveis	AAV n (%)		Valor p
	+	-	
História de gravidez			
Sim	68 (81)	166 (85)	0,48
Não	16 (19)	30 (15)	
Idade 1ª gestação*			
<15 anos	4 (6)	1 (0,6)	0,03
≥ 15 anos	64 (94)	161 (99,4)	
Número filhos			
Nenhum	18 (21)	34 (17)	0,71
1-3 filhos	52 (62)	128 (65)	
≥ 4 filhos	14 (17)	35 (18)	

* Referente às 244 mulheres que engravidaram.

O teste de digestão enzimática (RFLP) produziu fragmentos que corresponderam ao AAV2 em todas as amostras positivas para AAV, tanto na 1ª quanto na 2ª coleta. (Figura 19).

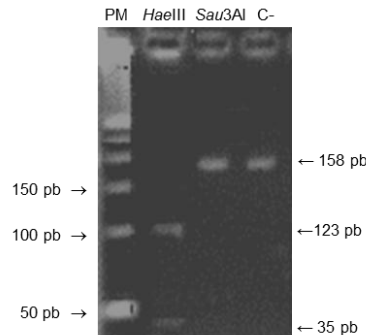


Figura 19. Digestão enzimática dos amplicons positivos para AAV. Eletroforese em gel de agarose a 3,0% corado com EtBr, do produto da nPCR para AAV2, 3 e 5 após digestão com enzimas de restrição *HaeIII* e *Sau3AI*. Col 1: padrão de peso molecular (100 pb); Col 2: fragmentos de 123 pb e 35 pb obtidos por digestão com *HaeIII*; Col 3: amplicon não digerido com *Sau3AI*.

5.9 INFECÇÃO MISTA AAV-HPV

Infecção mista AAV-HPV ocorreu em 18% (51/281) e em 11,5% (18/154) do total de amostras de 1ª e 2ª coletas, respectivamente (Gráfico 2). Das amostras positivas para AAV, 61% (51/84) de 1ª coleta e 43% (18/42) de 2ª coleta foram HPV positivas (Tabela 16); enquanto que, das amostras positivas para HPV, 33% (51/157) de 1ª coleta e 31,5% (18/57) de 2ª coleta foram AAV positivas (Tabela 16). A relação da infecção mista e citologia estão apresentadas na Tabela 17.

Tabela 16. Distribuição dos casos positivos e negativos de AAV em relação ao HPV nos espécimes cervicais de 1ª coleta (n=281) e 2ª coleta (n=156).

HPV	AAV			
	1ª coleta		2ª coleta	
	+	-	+	-
+	51 (61%)	106 (54%)	18 (43%)	39 (34%)
-	33 (39%)	91 (46%)	24 (57%)	75 (66%)
Total	84	197	42	114

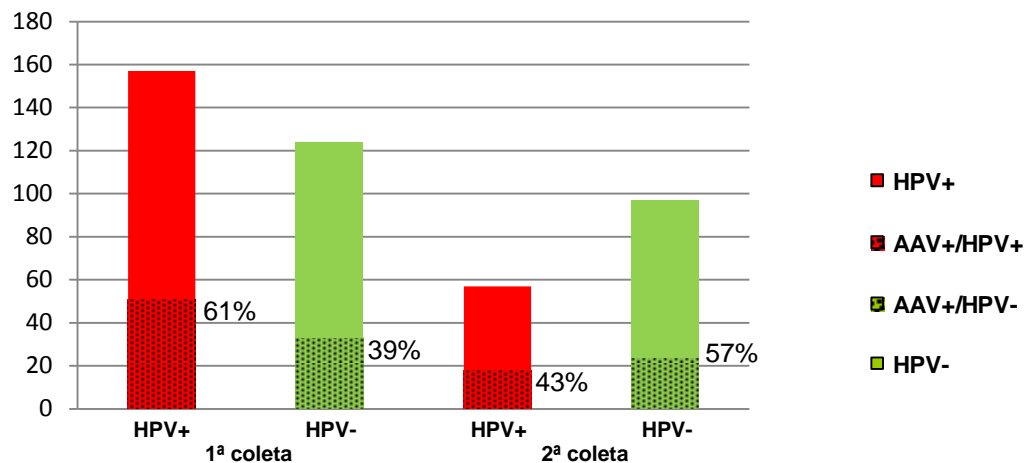


Gráfico 2. Infecção por AAV e HPV nas duas coletas.

Tabela 17. Prevalência de infecção mista AAV-HPV em relação ao exame citopatológico.

Citologia	Infecção mista AAV-HPV (%)		Total
	+	-	
Grupo 1	25 (39,1)	136 (60,9)	161
Grupo 2	11 (59,1)	54 (40,9)	65
Grupo 3	19 (94,1)	37 (5,9)	55
Total	51	227	281

Foi realizada análise de regressão multinominal para avaliar o risco de desenvolvimento de lesões induzidas por HPV em relação à presença do AAV (Tabela 18), onde foi demonstrado que a presença do AAV reduziu em 1,3 vezes a chance de desenvolvimento de lesão intraepitelial de alto grau (Grupo 3) em relação às mulheres negativas para AAV ($p < 0,001$).

Tabela 18. Análise da presença ou ausência de AAV nas amostras positivas para HPV em relação aos achados citológicos.

Citologia	OR (IC 95%)	
	AAV+/HPV+	AAV-/HPV+
Grupo 3	2,6 (1,4 - 5,5)	3,3 (2,0 - 6,6)
Grupo 2	1,1 (0,5 - 2,5)	2,5 (1,4 - 3,3)
Grupo 1	1 (ref)	1 (ref)

6 DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou a infecção por AAV e HPV em mulheres com diferentes graus de lesão de cérvix uterina, em dois momentos, objetivando evidenciar a relação entre as infecções virais e a evolução das lesões cervicais. Além disso, realizou levantamento dos tipos de HPV presentes na população de estudo, assim como de variantes de HPV16 e sua relação com lesão cervical.

As taxas de incidência de câncer no Brasil, apontam o câncer de colo de útero (CCU) em terceiro lugar, podendo chegar a ser o primeiro na região Norte (INCA, 2013). Os HPV de alto risco (HR-HPV) são reconhecidamente caracterizados como agentes causadores de CCU. Na maioria dos casos, a infecção por HPV é transitória e cofatores como idade da paciente, tipo e persistência viral favorecem o desenvolvimento de malignidade. Algumas variantes gênicas de HPV16 e 18 apresentam um maior potencial maligno. Infecção mista por AAV e HPV pode ser encontrada com certa frequência no trato genital e ambos os vírus podem interferir no ciclo replicativo um do outro, com proteínas do AAV inibindo a replicação do HPV, consequentemente diminuindo a possibilidade de progressão maligna na cérvix induzida por este.

6.1 FREQUÊNCIA DE HPV

Neste estudo, as metodologias moleculares PCR e captura de híbridos foram utilizadas para detecção e tipagem de HPV em espécimes cervicais, paralelamente ao exame citológico, e o índice *kappa* demonstrou boa concordância entre ambas. Porém, o ensaio de captura de híbridos deixou de detectar 20% das amostras positivas para HPV, destes, 14 casos apresentavam lesões cervicais, incluindo duas mulheres com lesão de alto grau. Estudos de meta-análise indicam que o teste de HPV tem melhor *performance* que repetidas citologias (Gillison et al., 2012), mas carece de especificidade para lesão. Portanto, o uso da citologia é essencial em conjunto ao teste de HPV ou seguindo detecção de HR-HPV, como tem sido o protocolo em alguns países. Ensaio clínico randomizado, realizados com mulheres com mais de 30 anos de idade, mostraram uma diminuição na detecção de HSIL no segundo *round* da triagem após ter usado teste molecular e citologia combinados, quando comparado com uso da citologia apenas (Naucler et al., 2007;

Bulkmans et al., 2007; Kitchener et al., 2009; Rijkaart et al., 2012). Nos Estados Unidos já existe a recomendação para o uso do co-teste (citologia + teste para HPV), a partir de março de 2012, em mulheres com idade entre 30 e 65 anos (Moyer, 2012). Uma meta-análise publicada recentemente demonstrou que os estudos de triagem com a realização do co-teste aumenta a taxa de detecção de NIC2+ e diminui significativamente as taxas de detecção subsequente de NIC2+ ou NIC3+, quando comparado com a triagem baseada apenas na citologia (Bouchard-Fortier et al., 2014). Além disso, o custo na inclusão do teste molecular na rotina se mostrou mais econômico se comparado aos custos com tratamento e acompanhamento de mulheres com lesão de alto grau e câncer cervical (Ostensson et al., 2013). Testes moleculares podem ainda ser utilizados no acompanhamento de mulheres tratadas, uma vez que estas tem um maior risco de recorrência (Kjaer et al., 2001). A taxa de recorrência de HSIL, num período de 2 anos, varia numa média de 8%, e o risco de recorrência é ainda maior em mulheres acima de 50 anos (Kjaer et al., 2001).

O teste de captura de híbridos pode ser considerado um teste semi-quantitativo, já que se pode estimar a carga viral a partir dos resultados de unidades relativas de luz (URL) emitidas por mL de amostra. Neste estudo, a carga viral obtida nas amostras positivas para HR-HPV, indicou que 60% dos casos de regressão da lesão ocorreram em casos com baixa URL (<100 pg/mL). De fato, considera-se que haja um maior risco para progressão oncogênica os casos que apresentam elevada carga viral (Sarian et al., 2003; Túlio et al., 2007; Gravitt et al., 2007; Muñoz et al., 2009).

Não somente a presença de HPV em espécime cervical seguido por citologia traz em si um incremento na sensibilidade de detecção de lesões, quanto mais importante ainda, é que o tipo viral seja caracterizado como sendo ou não de alto risco. Neste sentido, os métodos utilizados para determinação do genótipo de HPV neste estudo, RLB e RFLP, apresentam ambos vantagens e desvantagens. Comparando-se os métodos de tipagem utilizados, a sensibilidade de RLB foi maior, principalmente por se tratar de um método de hibridização, ou seja, o produto de PCR pode ser confirmado a partir da hibridização com sondas específicas. Outra vantagem da RLB é a possibilidade de identificar infecções múltiplas, o que torna-se muito difícil na RFLP, pela quantidade de fragmentos digeridos. Além disso a possibilidade de se trabalhar com até 45 amostras de uma só vez, faz da RLB um

método muito eficiente na vigilância epidemiológica. Entretanto, justamente por utilizar sondas específicas para certos tipos de HPV, aqueles tipos não investigados não serão detectados. O conhecimento/monitoramento dos tipos de HPV presentes na população é de grande importância, principalmente na era pós-vacinal, em que os tipos presentes nas vacinas podem desaparecer por pressão seletiva e portanto, outros tipos podem destacar-se como prevalentes.

De um modo geral os HR-HPV são os de maior prevalência na literatura mundial, descritos em frequência que podem variar de 42% a 86% (Cosser et al., 2013, Miranda et al., 2012, Lippman et al., 2010; Mollers et al., 2012; Perrons et al., 2005; Sammarco et al., 2013; Stevens et al., 2009). Este fato também foi observado no presente estudo, que os evidenciou em frequência ainda maior nas amostras de ambas as coletas (93% e 92%) sendo os cinco tipos mais frequentes de ambas as coletas de alto risco oncogênico (16>58>52>53>51).

O HPV16, o mais prevalente tanto na primeira como na segunda coleta (19% e 22%), foi detectado em diferentes cidades no Brasil com frequência variando entre 18,6 - 52,2% (Mattos et al., 2011; Rosa et al., 2008; Oliveira et al., 2010; Castro et al., 2011; Baldez da Silva et al., 2012). Na realidade, com exceção da África Oriental, China, Japão e Taiwan, o HPV16 é o tipo mais prevalente em todo mundo (Clifford et al., 2005; Ripabelli et al., 2010; Wu et al., 2010). Estudos com amostras da América do Sul apontam também o HPV58 como o segundo tipo de HPV mais frequentemente detectado. O HPV18, o 3º mais frequente nos casos de 1ª coleta, foi detectado em apenas 1 caso de 2ª coleta, o que pode ser devido ao número menor de amostras obtidas. Apesar deste tipo estar fortemente associado com casos de CCU, sua prevalência é menor na América do Sul e Central em relação aos demais continentes (Muñoz et al., 2004).

Apesar de comum, a maioria das infecções por HPV é transitória, ou seja, de resolução espontânea, e apenas uma pequena proporção de mulheres continua positiva para o mesmo tipo de HPV após seis a 12 meses (Franco et al., 1999; Hildesheim et al., 1994; Ho et al., 1998; Molano et al., 2003; Moscicki et al., 1998; Richardson et al., 2003). Considerando o desfecho da infecção por HPV no presente estudo, a resolução ocorreu em 32% dos casos, um ano após a detecção inicial. De um modo geral, entre 10 e 60% das mulheres com infecção pelo HPV ainda estará com o mesmo tipo viral um ano mais tarde, e menos da metade continuará a ser

positiva após 12 meses (Richardson et al., 2003; Woodman et al. 2001). Entretanto, não está claro se ocorre completa resolução da infecção ou se o vírus permanece latente nas células basais, dificultando sua detecção (Trottier & Franco, 2006).

Considerando o desfecho da lesão citológica, foi observado que a infecção por HPV foi transitória em mais de 40% dos casos de regressão da lesão. Este fato pode ser interpretado como uma infecção transitória de fato, ou como resultado do tratamento da lesão. Como o método molecular apresenta alta sensibilidade mas baixa especificidade para lesão cervical, o exame cito-histopatológico ganha uma importância destacada em evidenciar as lesões induzidas por HPV, conforme destacado por outros estudos (Castle & Cremer, 2013; Ostensson et al., 2013; Rossi et al., 2014).

Foi observada uma incidência de 8,4% (13/156) de amostras com tipos distintos de HPV dos encontrados na 1ª coleta. Estudos de Mollers et al. (2012) encontraram taxas de 59% de incidência de diferentes tipos, após um ano da primeira detecção. Entretanto, não é possível distinguir se estes casos se tratam de uma reativação de uma infecção latente, como mencionado anteriormente, ou de nova infecção com distintos tipos de HPV. Infecções por HR-HPV tendem a persistir mais tempo do que por LR-HPV (Richardson et al., 2003; Woodman et al. 2001). A provável persistência, ou seja, encontro do mesmo tipo viral nos dois momentos de coleta, ocorreu em 28,2% dos casos, sendo os HR-HPV encontrados na maior parte deles (94%). É importante considerar que, para os tipos mais comuns de HPV, como HPV16, é praticamente impossível distinguir infecção persistente de uma reinfecção pelo a partir do mesmo ou de parceiro sexual diferente. A persistência viral está intimamente relacionada às lesões uterinas e, neste estudo, foi demonstrado que nos casos de progressão da lesão, 62,5% ocorreram nos casos de persistência da infecção.

Diversos estudos relataram frequências variáveis de infecções mistas de HPV, de 10% a 80%, que podem ser devido a fatores geográficos, étnicos, comportamentais e também de sensibilidade das técnicas utilizadas para a genotipagem (Schmitt et al, 2010; Spinillo et al, 2009;. Trottier et al, 2006). Este tipo de infecção foi um achado comum nas amostras de ambas as coletas que apresentaram até cinco tipos distintos de HPV. O papel das infecções mistas na duração de uma infecção não está claro, no entanto, Ho et al. (1998) e Perrons et al. (2005) encontraram

associação destas com infecção persistente. Neste estudo as infecções mistas não estiveram associadas com nenhum desfecho de citologia, embora o número de amostras não tenha sido para esta análise.

Estudos demonstraram que a probabilidade de regressão de casos de NIC 1 (LSIL), 2 e 3 (ambos HSIL) não tratadas são de 60%, 40% e 33%, respectivamente; persistência da lesão ocorre em 20-30% de NIC 1 e em 40% de NIC 2; taxas de progressão de NIC 3 para CA são de 10-12% (Howlader et al., 2010; Ostör, 1993; Schiffman & Solomon, 2003). Em todos os casos com dados para desfecho da lesão, os HR-HPV estavam presentes em todos os tipos de desfecho. A maior parte dos casos de regressão da lesão se deu em mulheres com lesão de baixo grau (LSIL), o que evidencia a resolução espontânea de LSIL, uma vez que este tipo de lesão não recebe tratamento. A ausência de lesão nas amostras de segunda coleta foi maior entre as mulheres que apresentaram HSIL na primeira coleta, o que se deve a abordagem dessas mulheres, que consiste na realização do diagnóstico e do tratamento em uma única visita, realizado em nível ambulatorial, por meio da excisão da lesão ou da conização para casos de CA (INCA, 2011).

Além de fornecer informações quanto à possível persistência viral, a determinação dos tipos de HPV fornece dados para o monitoramento de eficácia das vacinas bivalentes ou tetravalentes licenciadas para comercialização (Harper et al., 2006; Villa et al., 2006). Dos tipos preveníveis pelas vacinas licenciadas, uma grande prevalência do HPV16 foi encontrada entre as mulheres participantes deste estudo, entretanto, foi baixa a prevalência do tipo 18, conforme previamente mencionado, assim como dos LR-HPV 6 e 11. Dos tipos relacionados aos HPV16 e 18, para os quais foi descrita proteção cruzada (HPV31, HPV33 e HPV45) (Bonanni et al., 2009; Paavonen et al., 2009), o tipo 31 foi detectado em frequência relativamente elevada na 1ª coleta, enquanto os tipos 33 e 45 foram encontrados com baixa frequência. Portanto, torna-se extremamente importante a determinação dos tipos de HPV em diversas regiões, tanto para avaliar a eficácia das vacinas licenciadas para comercialização, como para o desenvolvimento de segunda geração de vacinas. Uma vacina nonavalente, ainda em fase III de estudo, terá um maior efeito protetor, pois além dos quatro tipos preveníveis, irá conferir proteção contra HPV31, 33, 45, 52 e 58 (Merck&Co, 2012). Com a prevalência apresentada no estudo, a vacina quadrivalente teria uma proteção de cerca de 30% das mulheres participantes,

enquanto a nonavalente conferirá proteção para 50% da população de estudo. Além disso, a determinação dos tipos de HPV também é crucial para melhor determinação de prognóstico e monitoramento das mulheres infectadas por esse vírus.

A identificação das variantes de HPV16 está discutida no Apêndice B. Todas as amostras de HPV16 sequenciadas apresentaram, ao menos, uma alteração nucleotídica, em relação à sequência protótipo. A linhagem mais frequente foi a A1, pertencente ao grupo das variantes europeias, seguida pelas não-europeias Af-2 e AA. Um estudo conduzido com amostras da região Centro-Oeste, identificou a variante AA como a segunda linhagem mais frequente de HPV16, sendo as amostras do grupo de variantes europeias também a mais comum (Cruz et al., 2004). Foram descritas variantes AA/NA em amostras de câncer cervical, podendo estar associado a diferenças na atividade transcricional, que foi demonstrada ser maior que nas variantes E (Sichero et al., 2012). Este fato pode ser uma das explicações para a associação entre as variantes NE e os casos NIC3+ encontrada nesse estudo. A diferença geográfica na distribuição das variantes de HPV16 reflete, provavelmente, a população da região, constituída por imigração de europeus, índios nativos e descendentes africanos. Resultados similares sugerem que as variantes de HPV16 refletem padrões de migração, relativamente recentes, da população humana (Bernard, 2013).

6.2 FREQUÊNCIA DE AAV

Após a detecção molecular de HPV, foi realizada a caracterização da frequência de AAV, assim como sua relação com lesões uterinas induzidas pelo papilomavírus.

A prevalência total do AAV encontrada neste estudo, entre as mulheres atendidas no Ambulatório de Colposcopia do HUCAM, de 30%, positivas ou negativas para HPV, foi superior a de estudos anteriores que demonstraram taxas de prevalência em: i) secreção cervical de mulheres coreanas (16,3%) (Hyun-Sun et al., 2006); ii) *swab* genital de mulheres israelitas (18%) (Friedmant-Einat et al., 1997); iii) secreção cervical de gestantes e não gestantes no sudeste do Brasil (25,5%) (Freitas et al. 2009); iv) amostras de *swab* cervical de parceiras de alemães férteis e inférteis (26,3%) (Erles et al., 2001). Outros estudos, em que o AAV foi pesquisado por PCR em secreção cervical revelaram prevalência variando de 1,4% a 70,7% (Odunsi et

al., 2000; Coker et al., 2001; Venturoli et al., 2001; Grce et al., 2004; Agorastos et al., 2008). Esta ampla variação na taxa de prevalência do AAV pode se dever à variação de amostra e ao tipo de metodologia empregada na detecção. Deve ser observada, ainda, a possibilidade de variação geográfica na prevalência do AAV, já que os estudos citados foram realizados com amostras provenientes de várias regiões do mundo como Europa, Estados Unidos, Brasil, África e Coréia (Friedmant-Einat et al., 1997; Odunsi et al., 2000; Coker et al., 2001; Erles et al., 2001; Venturoli et al., 2001; Grce et al., 2004; Freitas et al., 2009; Hyun-Sun et al., 2006; Agorastos et al., 2008).

A detecção de AAV no segundo momento de coleta revelou prevalência semelhante à do primeiro momento (27,3%), sendo que no período de um ano entre as coletas de amostras realizadas, foi demonstrado que 10% das infecções foram persistentes, enquanto 22%, aparentemente se resolveram. Estes dados de resolução ou persistência da infecção por AAV não foram demonstrados por outros pesquisadores, e serão discutidos mais adiante acerca de sua participação da progressão de lesão induzida por HPV.

Considerando as variáveis sócio-demográficas, esperava-se que, por se tratar de um vírus que pode ser transmitido sexualmente e, portanto compartilha os fatores de risco presentes nas outras DSTs, sua prevalência fosse maior entre as mulheres com maior número declarado de parceiros sexuais, fato que não foi observado no presente estudo. Este resultado corrobora o observado por Coker et al (2001), que não demonstraram aumento na prevalência de AAV em relação ao número de parceiros sexuais de mulheres da Carolina do Sul. A análise de outros padrões sociais e comportamentais relacionados à infecção por AAV tinha sido realizada apenas em outro estudo, onde foi demonstrado que somente a infidelidade do parceiro foi um fator estatisticamente associado (Coker et al., 2001). Os dados sócio-demográficos das mulheres participantes deste estudo corroboram esta afirmação, onde não foram identificadas características associadas com a presença ou ausência de AAV.

Em todas as amostras positivas para AAV foi encontrado o mesmo perfil de digestão, que correspondeu ao tipo AAV2, tanto na primeira quanto na segunda coleta, embora outros tipos de AAV possam ser detectados em amostras de origem humana. Nosso grupo de pesquisa detectou AAV2 e AAV5 em, respectivamente, 81% e 19% em amostras de secreção cervical, e em 100% e 0% em tecidos de

aborto (decíduas e vilosidades coriônicas) (Pereira et al., 2010; Freitas et al., 2009). Ainda, outros pesquisadores descrevem o AAV2 como o mais frequente na população humana, entretanto, trata-se do único tipo pesquisado na maioria dos estudos sobre a sua prevalência (Grossman et al., 1992; Malhomme et al., 1997; Tobiasch et al., 1998; Walz et al., 2001; Coker et al., 2001; Smith et al., 2001; Ahn et al., 2003; Hyun-Sun et al., 2006; Berns e Parrish, 2007). Como citado anteriormente, deve ser levado em consideração a metodologia utilizada na pesquisa do AAV, já que os tipos descritos no trato genital podem não ter sido investigados. Além disso, alguns fatores como permissividade celular e coinfeção com vírus *helper* podem atuar na detecção de AAV.

6.3 INFECÇÃO MISTA AAV-HPV E RELAÇÃO COM CITOLOGIA

Os AAVs, como vírus dependentes de *helper*, necessitam estar em coinfeção para realizarem infecção produtiva e o HPV tem sido o vírus mais frequentemente encontrado no trato genital em associação com AAV (Berns, 1996; Malhomme et al., 1997; Walz et al., 1997; Grce et al., 2004). Neste sentido, o AAV foi encontrado em maior frequência nas amostras positivas para HPV em relação às negativas para HPV na primeira coleta (61% x 39%). Este dado de infecção mista está de acordo com os obtidos por alguns outros estudos, que a descreveram em até 83% dos casos (Malhomme et al., 1997; Venturoli et al., 2001; Grce et al., 2004). Ocorrência maior de DNA do AAV nas amostras onde o HPV também estava presente pode ser devido a replicação produtiva, induzida por HPV, possibilitando a detecção de seu DNA. Nos casos em que o HPV não foi detectado existe a probabilidade de outros vírus *helper* do AAV estarem presentes, como os herpes vírus citomegalovírus, HHV-2, HHV-6, HHV-7, comumente encontrados na população (Lanham et al., 2001; Smith et al., 2002; Oliveira et al., 2003; Spano et al., 2004). Por outro lado, considerando a sensibilidade da técnica de PCR, o genoma de AAV poderia ser detectado mesmo em estado de latência, quando está integrado no cromossoma celular, mas em percentagem menor do que quando reativado em presença de vírus *helper*. Replicação autônoma do AAV foi observada ocorrer em circunstâncias de estresse celular (radiação UV) ou em tecidos em diferenciação, como em queratinócitos e em tecido embrionário (Burguete et al., 1999; Meyers et al., 2000;

Kiehl et al., 2002). Entretanto, este fenômeno ainda não foi descrito em cérvix uterina.

A prevalência de AAV foi analisada ainda conforme o perfil apresentado ao exame citológico das pacientes encaminhadas ao Ambulatório de Colposcopia do HUCAM. Nas amostras com citologia normal, DNA do AAV estava presente em 29,3%; entretanto, estudo semelhante realizado com amostras de secreção cervical de mulheres inglesas apresentando citologia cervical normal encontrou a menor prevalência relatada para o AAV (1,4%) (Odunsi et al., 2000). Nos casos de HSIL, AAV foi detectado em 34%, sendo todos os casos em infecção mista com HPV. Assim como para os estudos de prevalência de AAV em amostras sem alteração cervical, a taxa deste vírus também é variada em relação às neoplasias intraepiteliais, relatada desde 10% a 70% dos casos de NIC 1 e 2 (Tobiasch et al., 1994; Coker et al., 2001; Ahn et al., 2003; Hyun-Sun et al., 2006; Agorastos et al., 2008). Análise de regressão multinomial demonstrou que nos casos em que o AAV estava presente, a chance de desenvolvimento de lesões intraepiteliais de alto grau induzidas por HPV, foi 1,3 vezes menor que nos casos negativos para AAV. Este fato está de acordo com outros estudos em que foi demonstrada associação do AAV com um risco reduzido de progressão para lesões de alto-grau ou em que o título de anticorpos para AAV estava inversamente associado com CC (Coker et al., 2001; Smith et al., 2001; Agorastos et al., 2008; Freitas et al., 2012). Entretanto, alguns investigadores não encontraram evidência da ação inibitória do AAV na carcinogênese (Strickler et al., 1999; Odunsi et al., 2000; Ahn et al., 2003; Hyun-Sun et al., 2006). Portanto, diante destes achados controversos, um estudo conduzido com um número significativo de amostras para cada grupo de lesão cervico-uterina poderá contribuir na compreensão da ação do AAV na restrição ou não do desenvolvimento de lesão de alto grau.

Na realidade, o que alguns outros estudos sugerem é que a inibição da replicação e da transcrição de genes do HPV pelo AAV exerceria o papel protetor contra a malignidade cervical induzida por HPV (Hermonat et al., 2000; Ogston et al., 2000; Smith et al., 2001; Agrawal et al., 2002; Walz et al., 2002; Ahn et al., 2003; Hermonat et al., 2005; You et al., 2006; Al-Daraji, Smith, 2009; Freitas et al., 2012). Porém, o envolvimento bidirecional entre estes vírus é bastante complexo e parece estar associado com a carga infecciosa, a temporalidade da infecção sequencial

(Hermonat et al., 1998; You et al., 2006) que refletiu em uma menor ação supressora pelo AAV se ele já se encontrava em estado de latência quando da infecção pelo HPV. Certamente, estes fenômenos carecem de mais estudos para esclarecimento desta interação no organismo humano.

6.4 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O tamanho da amostra foi uma limitação apresentada nesta pesquisa. Inicialmente, como as amostras encaminhadas ao Ambulatório de Colposcopia apresentam suspeita de lesão citológica, era de se esperar que um maior número de amostras com lesão fossem identificadas, sendo que 57% tratavam-se de amostras com citologia normal. Ainda, houve dificuldade no recrutamento das pacientes para a realização da 2ª coleta de amostra um ano após a primeira visita. Apesar de todas apresentarem um cadastro no setor de prontuários do Hospital, muitos deles estavam desatualizados, o que impossibilitou o contato com 31% das pacientes. Outras ainda, mostraram desinteresse em continuar participando do estudo, seja por estarem realizando acompanhamento com outro profissional (9%), seja pela distância de sua residência do hospital (3%). Ainda houve um caso de falecimento, um caso de gestação e um caso em que a paciente estava em período pós-operatório, o que impediu a realização da segunda coleta. Dentre as pacientes que não voltaram para realizar a segunda coleta, 30% delas tinham lesão de alto grau, ou seja, estão em risco de desenvolver uma progressão maligna, se não estiverem fazendo acompanhamento / tratamento com outro profissional.

7 CONCLUSÕES

- Acompanhamento de frequência de HPV em dois momentos, demonstrou alta taxa de persistência viral, indicando risco de recorrência da lesão;
- Baixa taxa de progressão da lesão indicou o sucesso do tratamento de lesões de alto grau;
- HPV de alto-risco e variantes de HPV16 europeias estiveram significativamente associadas a lesões de alto grau; corroborando os dados da literatura mundial;
- Os tipos mais frequentes de HPV, exceto HPV16, não foram os mesmos contemplados pela vacina, portanto, nessa população, 70% estaria sem proteção, mesmo se vacinadas;
- Risco de desenvolvimento de lesões cervicais induzidas por HPV foi menor nos casos positivos para AAV2.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Agorastos T, Chrisafi S, Lambropoulos AF, Mikos T, Constandinides TC, Schlehofer JR, Schlehofer B, Kotsis A, Bontis JN. Adeno-associated virus infection and cervical neoplasia: is there a protective role against human papillomavirus-related carcinogenesis? *Eur J Cancer Prev* 2008; 17: 364-368.
- Agrawal N, Mane M, Chiriva-Internati M, Roman JJ, Hermonat PL. Temporal acceleration of the human papillomavirus life cycle by adeno-associated virus (AAV) type 2 superinfection in natural host tissue. *Virology* 2002; 297: 203-210.
- Ahn WS, Bae SM, Chung JE, Lee HK, Kim BK, Lee JM, Namkoong SE, Kim CK, Sin J. Evaluation of adenoassociated virus 2 and human papilloma virus 16 and 18 infection in cervical cancer biopsies. *Gynec Oncol* 2003; 89: 105-111.
- Ahn WS, Bae SM, Lee HJ, Kim YW, Lee JM, Namkoong SE, Kim CK, Kim YW, Jin HS. Development of anticancer gene vaccine interacts with human papillomavirus oncoprotein inhibition. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 270-276.
- Al-Daraji WI, Smith JH. Infection and cervical neoplasia: facts and fiction. *Int J Clin Exp Pathol.* 2009;2(1):48-64.
- Alencar TR, Cerqueira DM, da Cruz MR, Wyant PS, Ramalho ED, Martins CR. New HPV-16 European and non-European variants in Central Brazil. *Virus Genes.* 2007 Aug;35(1):1-4.
- Arbyn M, Ronco G, Anttila A, Meijer CJ, Poljak M, Ogilvie G, Koliopoulos G, Naucler P, Sankaranarayanan R, Peto J. Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine.* 2012 Nov 20;30 Suppl 5:F88-99
- Arechavaleta-Velasco F, Ma Y, Zhang J, McGrath M, Parry S. Adeno-associated virus-2 (AAV-2) cause trophoblast dysfunction, and placental AAV-2 infection is associated with preeclampsia. *Am J Pathol* 2006; 168: 1951-1959.
- Arechavaleta-Velasco F, Gomez L, Ma Y, Zhao J, McGrath M, Sammel MD, Nelson DB, Parry S. Adverse reproductive outcomes in urban women with adeno-associated virus-2 infections in early pregnancy. *Human Reprod* 2008; 23: 29-36.
- Arroyo SL, Basaras M, Arrese E, Hernández S, Andía D, Esteban V, Garcia-Etxebarria K, Jugo BM, Cisterna R. Human papillomavirus (HPV) genotype 18 variants in patients with clinical manifestations of HPV related infections in Bilbao, Spain. *Virol J.* 2012 Nov 2;9:258.
- Atchison RW, Casto BC, McHammon W. Adenovirus-associated defective virus particles. *Science* 1965; 149: 754-756.
- Balakrishnan B, Jayandharan GR. Basic Biology of Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors Used in Gene Therapy. *Curr Gene Ther.* 2014 Mar 2.
- Baldez da Silva MF, Guimarães V, Silva MA, Medeiros do Amaral CM, Beçak W, Stocco RC, Freitas AC, Crovella S. Frequency of human papillomavirus types 16, 18, 31, and 33 and sites of cervical lesions in gynecological patients from Recife, Brazil. *Genet Mol Res.* 2012 Mar 1;11(1):462-6.
- Bandyopadhyay S, Raney KD, Liu Y, Hermonat PL. AAV-2 Rep78 and HPV-16 E1 interact in vitro, modulating their ATPase. *Biochemistry* 2008; 47: 845-856.
- Bantel-Schaal U, zur Hausen H. Characterization of the DNA of a defective human parvovirus isolated from a genital site. *Virology* 1984; 134: 52-63.
- Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 2005; 32: Suppl 1: S16-24.
- Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, Peyton CL, Bauer HM, Wheeler CM. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 1994; 170(5): 1077-1085.
- Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer* 2006; 118: 1071-1076.
- Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 2010; 401(1): 70-79.
- Bernard HU. Taxonomy and phylogeny of papillomaviruses: an overview and recent developments. *Infect Genet Evol* 2013;18: 357-361.
- Berns KI. Parvovirus replication. *Microbiol Rev* 1990; 54: 316-329.
- Berns KI, Linden RM. The cryptic life style of adeno-associated virus. *Bioessays* 1995; 17: 237-245.
- Berns K, Parrish CR. Parvoviridae, p. 2437-2477. In: Knipe D M, Howley P M, Griffin D E, Lamb R A, Martin M A, Roizman B, Straus S E (ed). *Fields Virology*, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, Yunes E, Garcia-Carranca A, Gonzalez-Lira G, Madrigal-de la Campa A. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(17): 1325-1330.
- Blacklow NR, Hoggan MD, Rowe WP. Isolation of adeno-associated viruses from man. *Proc natl Acad Sci USA* 1967; 58: 1410-1415.

- Blacklow NR, Hoggan MD, Kapikian AZ, Austin JB, Rowe WP. Epidemiology of adenovirus-associated virus infection in a nursery population. *Am J Epidemiol* 1968; 88: 368-378.
- Blechacz B, Russell SJ. Parvovirus vectors: use and optimisation in cancer gene therapy. *Expert Rev Mol Med* 2004; 6: 1-24.
- Bonanni P, Boccalini S, Bechini A. Efficacy, duration of immunity and cross protection after HPV vaccination: a review of the evidence. *Vaccine* 2009; 27: Suppl 1: A46-53.
- Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman M H, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796-802.
- Bosch FX, Lorincz AT, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 244-65.
- Bouchard-Fortier G, Hajifathalian K, McKnight MD, Zacharias DG, Gonzalez-Gonzalez LA. Co-testing for detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer compared with cytology alone: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Public Health (Oxf)*. 2014 Mar;36(1):46-55.
- Bulkmans NW, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Boeke AJ, Bulk S, Voorhorst FJ, Verheijen RH, van Groningen K, Boon ME, Ruitinga W, van Ballegooijen M, Snijders PJ, Meijer CJ. Human papillomavirus DNA testing for the detection of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and cancer: 5-year follow-up of a randomised controlled implementation trial. *Lancet* 2007; 370: 1764-1772.
- Buller RM, Janik JE, Sebring ED, Rose JA. Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J Virol* 1981; 40: 241-247.
- Burguete T, Rabreau M, Fontanges-Darriet M, Roset E, Hager HD, Koppel A, Bischof P, Schlehofer J R. Evidence for infection of the human embryo with adeno-associated virus in pregnancy. *Hum Reprod* 1999; 14: 2396-2401.
- Burguete T, Rabreau M, Fontanges-Darriet M, Roset E, Hager HD, Köppel A, Bischof P, Schlehofer JR. Evidence for infection of the human embryo with adeno-associated virus in pregnancy. *Hum Reprod*. 1999 Sep;14(9):2396-401.
- Castle PE, Cremer M. Human papillomavirus testing in cervical cancer screening. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2013 Jun;40(2):377-90.
- Castro MM, Farias IP, Borborema-Santos CM, Correia G, Astolfi-Filho S. Prevalence of human papillomavirus (HPV) type 16 variants and rare HPV types in the central Amazon region. *Genet Mol Res* 2011; 10: 186-196.
- Chejanovsky N, Carter BJ. Mutagenesis of an AUG codon in the adeno-associated virus rep gene: effects on viral DNA replication. *Virology* 1989; 173: 120-128.
- Chen Z, Terai M, Fu L, Herrero R, DeSalle R, Burk RD. Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses. *J Virol* 2005; 79: 7014-7023.
- Cheung AK, Hoggan MD, Hauswirth WW, Berns KI. Integration of adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human Detroit 6 cells. *J Virol* 1980; 33: 739-748.
- Chiorini JA, Yang L, Liu Y, Safer B, Kotin RM. Cloning of adeno-associated virus type 4 (AAV4) and generation of recombinant AAV4 particles. *J Virol* 1997; 71: 6823-6833.
- Chiorini JA, Kim F, Yang L, Kotin RM. Cloning and characterization of adenoassociated virus type 5. *J Virol* 1999; 73: 1309-1319.
- Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, Anh PT, Ferreccio C, Hieu NT, Matos E, Molano M, Rajkumar R, Ronco G, de Sanjosé S, Shin HR, Sukvirach S, Thomas JO, Tunsakul S, Meijer CJ, Franceschi S; IARC HPV Prevalence Surveys Study Group. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet* 2005; 366: 991-998.
- Coker AL, Russell RB, Bond SM, Pirisi L, Liu Y, Mane M, Kokorina N, Gerasimova T, Hermonat PL. Adeno-associated virus is associated with a lower risk of high-grade cervical neoplasia. *Exp Mol Pathol* 2001; 70: 83-89.
- Cornet I, Gheit T, Clifford GM, Combes JD, Dalstein V, Franceschi S, Tommasino M, Clavel C. Human papillomavirus type 16 E6 variants in France and risk of viral persistence. *Infect Agent Cancer*. 2013 Jan 23;8(1):4.
- Coser J, da Rocha Boeira T, Simon D, Kazantzi Fonseca AS, Ikuta N, Lunge VR. Prevalence and genotypic diversity of cervical human papillomavirus infection among women from an urban center in Brazil. *Genet Mol Res*. 2013 Feb 19;12(4):4276-85.
- Cricca M, Venturoli S, Leo E, Costa S, Musiani M, Zerbini M. Molecular analysis of HPV 16 E6I/E6II spliced mRNAs and correlation with the viral physical state and the grade of the cervical lesion. *J Med Virol*. 2009 Jul;81(7):1276-82.
- Cruz MR, Cerqueira DM, Cruz WB, Camara GN, Brígido MM, Silva EO, Carvalho LG, Martins CR. Prevalence of human papillomavirus type 16 variants in the Federal District, Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004 May;99(3):281-2.
- Dani SU. The challenge of vector development in gene therapy. Vector development in gene therapy Brazilian. *J Med Biol Res* 1999; 32: 133-145.

- de Sanjosé S, Muñoz N, Bosch FX, Reimann K, Pedersen NS, Orfila J, Ascunce N, González LC, Tafur L, Gili M, et al. Sexually transmitted agents and cervical neoplasia in Colombia and Spain. *Int J Cancer*. 1994 Feb 1;56(3):358-63.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17–27.
- Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci* 2006; 110: 525-541.
- D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis* 2009, 199(9): 1263-1269.
- Duan D, Li Q, Kao AW, Yue Y, Pessin JE, Engelhardt JF. Dynamins are required for recombinant adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* 1999; 73: 10371-10376.
- Erles K, Sebkova P, Schlehofer JR. Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV). *J Med Virol* 1999; 59: 406-411.
- Erles K, Rohde V, Thaele M, Roth S, Edler L, Schlehofer JR. DNA of adeno-associated virus (AAV) in testicular tissue and in abnormal semen samples. *Hum Reprod* 2001; 16: 2333-2337.
- Estrade C, Menoud PA, Nardelli-Haeffliger D, Sahli R. Validation of a low-cost human papillomavirus genotyping assay based on PGM1 PCR and reverse blotting hybridization with reusable membranes. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 3474-3481.
- Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol* 2002; 3: 11-16.
- Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Désy M, Rohan TE. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1999; 180: 1415-1423.
- Freitas LB, Pereira CC, Checon R, Leite JPG, Nascimento JP, Spano LC. Adeno-associated virus and human papillomavirus types in cervical samples of pregnant and non-pregnant women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 145(1): 41-44.
- Freitas LB. Prevalência de vírus adeno-associado e de coinfeção com papilomavírus humano em espécime cervical de mulheres soropositivas e soronegativas para HIV. 2009. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Doenças Infecciosas), Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES.
- Freitas LB, Mattos AT, Lima BMC, Miranda AE, Spano LC. Adeno-associated virus (AAV) may play a protective role on HPV-induced cervical lesions independent of HIV serostatus. *Int J STD & AIDS* 2012; 23(4): 258-261.
- Friedman-Einat M, Grossman Z, Mileguir F, Smetana Z, Ashkenazi M, Barkai G, Varsano N, Glick E, Mendelson E. Detection of adeno-associated virus type 2 sequences in the human genital tract. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 71-78.
- Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson JM. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *PNAS* 2002; 99: 11854–11859.
- Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, Lu Y, Calcedo R, Zhou X, Wilson JM. Clades of adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol* 2004; 78: 6381-6388.
- Gheit T, Simoes RT, Tommasino M, Donadi EA, Gonçalves MA. HPV16 variants in squamous intraepithelial lesions in human immunodeficiency virus-negative and -positive Brazilian women. *Viral Immunol*. 2006 Summer;19(2):340-5.
- Gilbert DM, Cohen SN. Bovine papillomavirus plasmids replicate randomly in mouse fibroblast throughout S phase of cell cycle. *Cell* 1987; 50: 59-68.
- Gillison ML, Broutian T, Pickard RK, Tong ZY, Xiao W, Kahle L, Graubard BI, Chaturvedi AK. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *JAMA*. 2012 Feb 15;307(7):693-703.
- Glauser DL, Saydam O, Balsiger NA, Heid I, Linden RM, Ackermann M, Fraefel C. Four-dimensional visualization of the simultaneous activity of alternative adeno-associated virus replication origins. *J Virol*. 2005 Oct;79(19):12218-30.
- Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 357-361.
- Gravitt PE, Kovacic MB, Herrero R, Schiffman M, Bratti C, Hildesheim A, Morales J, Alfaro M, Sherman ME, Wacholder S, Rodriguez AC, Burk RD. High load for most high risk human papillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease. *Int J Cancer* 2007; 121: 2787-2793.
- Grce M, Husnjak K, Matovina M, Milutin N, Magdic L, Husnjak O, Pavelic K. Human Papillomavirus, Cytomegalovirus, and Adeno-Associated Virus infections in pregnant and nonpregnant women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Microb* 2004; 42: 1341-1344.
- Gross GE, Barrasso R. Infecção por Papilomavírus humano. Atlas clínico de HPV. Porto Alegre: Artmed, 1999.
- Grossman Z, Mendelson E, Brok-Simoni F, Mileguir F, Leitner Y, Rechavi G, Ramot B. Detection of adeno-associated virus type 2 in human peripheral blood cells. *J Gen Virol* 1992; 73: 961-966.
- Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol*. 2003 Oct;52(5):696-704.

- Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B, Roteli-Martins CM, Jenkins D, Schuind A, Costa Clemens SA, Dubin G; HPV Vaccine Study group. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet*. 2006 Apr 15;367(9518):1247-55.
- Hermonat PL, Plott RT, Santin AD, Parham GP, Flick JT. Adeno-associated virus Rep 78 inhibits oncogenic transformation of primary human keratinocytes by a human papillomavirus type 16-ras chimeric. *Gynec Oncol* 1997; 66: 487-494.
- Hermonat PL, Meyers C, Groesbeck PP, Santin AD. Inhibition/stimulation of bovine papillomavirus by adeno-associated virus is time as well as multiplicity dependent. *Virology* 1998; 247: 240-250.
- Hermonat PL, Santin AD, Zhan D. Binding of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein and the adeno-associated virus Rep78 major regulatory protein in vitro and in yeast and the potential for downstream effects. *J Hum Virol* 2000; 3: 113-124.
- Hermonat PL, You H, Chiriva-Internati CM, Liu Y. Analysis of adeno-associated virus and HPV interaction. *Methods Mol Med*. 2005; 119: 397-409.
- Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, Greer CE, Zhang T, Scott DR, Rush BB, Lawler P, Sherman ME, et al. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis*. 1994 Feb;169(2):235-40.
- Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; 338(7): 423-428.
- Hoggan MD, Blacklow NR, Rowe WP. Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1966; 55: 1467-1474.
- Hoory T, Monie A, Gravitt P, Wu TC. Molecular epidemiology of human papillomavirus. *J Formos Med Assoc* 2008; 107(3): 198-217.
- Howley PM, Lowy DR. Papillomaviruses. In: Knipe D M, Howley P M, Griffin D E, Lamb R A, Martin M A, Roizman B, Straus S E (ed). *Fields Virology*, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- Huang SZ, Sheng M, Zhao JQ, Qiu XK, Zeng YT, Wang QS, He MX, Zhu JM, Liu WP, Li WW. Detection of sickle cell gene by analysis of amplified DNA sequences. *Yi Chuan Xue Bao* 1989; 16: 475-482.
- Hüser D, Heilbronn R. Adeno-associated virus integrates site-specifically into human chromosome 19 in either orientation and with equal kinetics and frequency. *J Gen Virol* 2003; 84: 133-137.
- Hyun-Sun J, Heung-Jae C, Byung-Hun K, Young-Lae C, Gye-Hyun N, Ho-Sun C, Chong-Kook K, Byoung-Don H, Su-Mi B, Woong-Shick A. Correlation of human papillomavirus and adeno-associated virus 2 infection in cytology with Korean women. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 604-609.
- IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol 90, 2007. Human Papillomaviruses. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol90/index.php>> Acesso em: 04 jan 2009.
- IARC – International Agency for Research on Cancer. IARC Handbooks of Cancer Prevention Volume 10: Cervix cancer screening. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/cervix-new.asp>> Acesso em: mar 2014.
- ICTV -International Committee on Taxonomy of Viruses. *Virua Taxonomy*: 2011 Release. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2011>> Acesso em: 01 mar 2012.
- Im DS, Muzyczka N. Factors that bind to adeno-associated virus terminal repeats. *J Virol*. 1989; 63: 3095-3104.
- Im DS, Muzyczka N. The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell* 1990; 61: 447-457.
- INCA – Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2012. Incidências de câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012/>>. Acesso em: 05 fev 2013.
- INCA - Instituto Nacional de Câncer. Diretrizes Brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoas_programas/site/home/nobrasil/programa_nacional_controle_cancer_co_lo_uter0> Acesso em: fev 2011.
- Junes-Gill K, Sichero L, Maciag PC, Mello W, Noronha V, Villa LL. Human papillomavirus type 16 variants in cervical cancer from an admixed population in Brazil. *J Med Virol* 2008; 80: 1639-1645.
- Kaludov N, Brown KE, Walters RW, Zabner J, Chiorini JA. Adeno-associated virus serotype 4 (AAV4) and AAV5 both require sialic acid binding for hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity. *J Virol* 2001; 75: 6884-6893.
- Kiehl K, Schlehofer JR, Schultzd R, Zugaibb M, Armbruster-Moraes E. Adeno-Associated Virus DNA in Human Gestational Trophoblastic Disease. *Placenta* 2002; 23: 410–415.
- King JA, Dubielzig R, Grimm D, Kleinschmidt JA. DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *EMBO J* 2001; 20: 3282-3291.

- Kitchener HC, Almonte M, Thomson C, Wheeler P, Sargent A, Stoykova B, Gilham C, Baysson H, Roberts C, Dowie R, Desai M, Mather J, Bailey A, Turner A, Moss S, Peto J. HPV testing in combination with liquid-based cytology in primary cervical screening (ARTISTIC): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2009; 10(7): 672-682.
- Kjaer SK, Chackerian B, van den Brule AJ, Svare EI, Paull G, Walbomers JM, Schiller JT, Bock JE, Sherman ME, Lowy DR, Meijer CL. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001 Feb;10(2):101-6.
- Kotin RM, Berns KI. Organization of adeno-associated virus DNA in latently infected Detroit 6 cells. *Virology* 1989; 170: 460-467.
- Kotin RM, Siniscalco M, Samulski RJ, Zhu XD, Hunter L, Laughlin CA, McLaughlin S, Muzyczka N, Rocchi M, Berns KI. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2211-2215.
- Kotin RM, Menninger JC, Ward DC, Berns KI. Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter. *Genomics* 1991; 10: 831-834.
- Laimins LA. Human papillomaviruses target differentiating epithelium for virion production and malignant conversion. *Semin Virol* 1996; 7: 305-313.
- Lambert PF. Papillomavirus DNA replication. *J Virol* 1991; 65: 3417-3420
- Lanham S, Herbert A, Basarab A, Watt P. Detection of cervical infections in colposcopy clinic patients. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2946-2950.
- Laughlin CA, Tratschin JD, Coon H, Carter BJ. Cloning of infectious adeno-associated virus genomes in bacterial plasmids. *Gene* 1983; 23: 65-73.
- Lee K, Magalhaes I, Clavel C, Birembaut P, Tommasino M, Zehbe I. Distribution of human papillomavirus 16 E6, L1, L2 and E2 gene variants in pre-malignant cervical disease. *Virus Res* 2008; 131:106-110.
- Lippman SA, Sucupira MC, Jones HE, Luppi CG, Palefsky J, van de Wijgert JH, Oliveira RL, Diaz RS. Prevalence, distribution and correlates of endocervical human papillomavirus types in Brazilian women. *Int J STD AIDS*. 2010 Feb;21(2):105-9.
- Londesborough P, Ho L, Terry G, Cuzick J, Wheeler C, Singer A: Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int J Cancer* 1996, 69:364-368.
- López-Saavedra A, González-Maya L, Ponce-de-León S, García-Carrancá A, Mohar A, Lizano M. Functional implication of sequence variation in the long control region and E2 gene among human papillomavirus type 18 variants. *Arch Virol* 2009; 154(5): 747-754.
- Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest* 2006, 116: 1167-1173.
- Lusby E, Fife KH, Berns KI. Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *J Virol* 1980, 34: 402-409.
- Malhomme O, Dutheil N, Rabreau M, Armbruster-Moraes E, Schlehofer JR, Dupressoir T. Human genital tissues containing DNA of adeno-associated virus lack DNA sequences of the helper viruses adenovirus, herpes simplex virus or cytomegalovirus but frequently contain human papillomavirus DNA. *J Gen Virol* 1997; 78: 1957-1962.
- de Mattos AT, de Freitas LB, Lima BM, Miranda AE, Spano LC. Diversity and uncommon HPV types in HIV seropositive and seronegative women attending an STI clinic. *Braz J Microbiol*. 2011 Apr;42(2):786-93.
- McBride AA. The papillomavirus E2 proteins. *Virology* 2013; 445(1-2):57-79.
- McPherson RA, Rosenthal LJ, Rose JA. Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated virus replication. *Virology* 1985, 147: 217-222.
- Mendelson E, Trempe JP, Carter BJ. Identification of the trans-acting Rep proteins of adeno-associated virus by antibodies to a synthetic oligopeptide. *J Virol*. 1986 Dec;60(3):823-32.
- Merck&Co. Merck's Investigational 9-valent HPV Vaccine, V503, Prevented 97 Percent of Cervical, Vaginal and Vulvar Pre-cancers Caused by Five Additional HPV Types, in Phase III Study. Disponível em: <<http://www.mercknewsroom.com/news-release/research-and-development-news/mercks-investigational-9-valent-hpv-vaccine-v503-prevente>> Acesso em: janeiro de 2014.
- Meyers C, Mane M, Kokorina N, Alam S, Hermonat PL. Ubiquitous human adeno-associated virus type 2 autonomously replicates in differentiating keratinocytes of a normal skin model. *Virology* 2000, 272: 338-346.
- Miranda PM, Pitol BC, Moran MS, Silva NN, Felix PM, Lima-Filho JL, Carneiro CM, Silva ID, Carvalho RF, Lima AA, Beçak W, Stocco RC. Human papillomavirus infection in Brazilian women with normal cervical cytology. *Genet Mol Res*. 2012 Jun 29;11(2):1752-61.
- Mizukami H, Ozawa K. Utility of AAV vectors derived from novel serotypes. *Yakugaku Zasshi* 2006, 126: 1021-1028.
- Mohr IJ, Clark R, Sun S, Androphy EJ, MacPherson P, Botchan MR. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* 1990, 250: 1694-1699.

- Molano M, Van den Brule A, Plummer M, Weiderpass E, Posso H, Arslan A, Meijer CJ, Muñoz N, Franceschi S; HPV Study Group. Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: a population-based, 5-year follow-up study. *Am J Epidemiol* 2003; 158(5):486-494.
- Mollers M, Scherpenisse M, van der Klis FR, King AJ, van Rossum TG, van Logchem EM, Feltkamp MC, Meijer CJ, Snijders PJ, Boot HJ, de Melker HE. Prevalence of genital HPV infections and HPV serology in adolescent girls, prior to vaccination. *Cancer Epidemiol*. 2012 Dec;36(6):519-24.
- Mori S, Wang L, Takeuchi T, Kanda T. Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology* 2004, 330: 375-383.
- Moscicki AB, Shiboski S, Broering J, Powell K, Clayton L, Jay N, Darragh TM, Brescia R, Kanowitz S, Miller SB, Stone J, Hanson E, Palefsky J. The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. *J Pediatr*. 1998 Feb;132(2):277-84.
- Moyer VA; U.S. Preventive Services Task Force. Screening for cervical cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med*. 2012 Jun 19;156(12):880-91, W312.
- Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 2000, 19: 1-5.
- Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJ, Bosch FX. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 2002, 359: 1093-1101.
- Muñoz N1, Méndez F, Posso H, Molano M, van den Brule AJ, Ronderos M, Meijer C, Muñoz A; Instituto Nacional de Cancerología HPV Study Group. Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis* 2004, 190(12): 2077-2087.
- Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 2006, 24 Suppl 3: S3/1-10.
- Muñoz N, Hernandez-Suarez G, Méndez F, Molano M, Posso H, Moreno V, Murillo R, Ronderos M, Meijer C, Muñoz A; Instituto Nacional de Cancerología HPV Study Group. Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women. *Br J Cancer* 2009, 100(7): 1184-90.
- Muramatsu S, Mizukami H, Young NS, Brown KE. Nucleotide sequencing and generation of an infectious clone of adeno-associated virus 3. *Virology* 1996, 221: 208-217.
- Muzyczka N. Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992, 158: 97-129.
- Muzyczka N, Berns KI. Parvoviridae: The viruses and their replication. In: Fields B N, Knipe D M. *Fundamental Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2001.
- Naucleer P, Ryd W, Törnberg S, Strand A, Wadell G, Elfgrén K, Rådberg T, Strander B, Johansson B, Forslund O, Hansson BG, Rylander E, Dillner J. Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *N Engl J Med* 2007, 357(16): 1589-1597.
- Odunsi KO, van Ee CC, Ganesan TS, Shelling AN. Evaluation of the possible protective role of adeno-associated virus type 2 infection in HPV-associated premalignant disease of the cervix. *Gynecol Oncol*. 2000 Sep;78(3 Pt 1):342-5.
- Ogston P, Raj K, Beard P. Productive replication of adeno-associated virus can occur in human papillomavirus type 16 (HPV-16) episome-containing keratinocytes and is augmented by the HPV-16 E2 protein. *J Virol* 2000, 74: 3494-3504.
- Oliveira SA, Turner DJ, Knowles W, Nascimento JP, Brown DWG, Ward KN. Primary human herpesvirus-6 and -7 infections, often coinciding, misdiagnosed as measles in children from a tropical region of Brazil. *Epidemiol Infect* 2003, 130: 1-7.
- Oliveira LH, Ferreira MD, Augusto EF, Melgaço FG, Santos LS, Cavalcanti SM, Rosa ML. Human papillomavirus genotypes in asymptomatic young women from public schools in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010 Jan-Feb;43(1):4-8.
- Ong CK, Chan SY, Campo MS, Fujinaga K, Mavromara-Nazos P, Labropoulou V, Pfister H, Tay SK, ter Meulen J, Villa LL, et al. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol*. 1993 Nov;67(11):6424-31.
- Östensson E, Hellström AC, Hellman K, Gustavsson I, Gyllensten U, Wilander E, Zethraeus N, Andersson S. Projected cost-effectiveness of repeat high-risk human papillomavirus testing using self-collected vaginal samples in the Swedish cervical cancer screening program. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2013 Jul;92(7):830-40
- Ostör AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993; 12(2): 186-192.
- Paavonen J, Naud P, Salmerón J, Wheeler CM, Chow SN, Apter D, Kitchener H, Castellsague X, Teixeira JC, Skinner SR, Hedrick J, Jaisamrarn U, Limson G, Garland S, Szarewski A, Romanowski B, Aoki FY, Schwarz TF, Poppe WA, Bosch FX, Jenkins D, Hardt K, Zahaf T, Descamps D, Struyf F, Lehtinen M, Dubin G; HPV PATRICIA Study Group. 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 Jul 25;374(9686):301-14

- Parks WP, Boucher DW, Melnick JL, Taber LH, Yow MD. Seroepidemiological and ecological studies of the adenovirus-associated satellite viruses. *Infect Immun* 1970, 2: 716-722.
- Pereira CC, de Freitas LB, de Vargas PR, de Azevedo ML, do Nascimento JP, Spano LC. Molecular detection of adeno-associated virus in cases of spontaneous and intentional human abortion. *J Med Virol*. 2010, 82: 1689-1693.
- Perrons C, Brink N, Jalal H, Watts P, Jelley R. The impact of high risk human papillomavirus testing in an inner London colposcopy clinic. *J Med Virol*. 2005 Aug;76(4):576-82.
- Qing K, Mah C, Hansen J, Zhou S, Dwarki V, Srivastava A. Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med* 1999, 5: 71-77.
- Rabelo-Santos SH, Villa LL, Derchain SF, Ferreira S, Sarian LO, Angelo-Andrade LA, do Amaral Westin MC, Zeferino LC. Variants of human papillomavirus types 16 and 18: histological findings in women referred for atypical glandular cells or adenocarcinoma in situ in cervical smear. *Int J Gynecol Pathol*. 2006 Oct;25(4):393-7.
- Richardson H, Kelsall G, Tellier P, Voyer H, Abrahamowicz M, Ferenczy A, Coutlée F, Franco EL. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003 Jun;12(6):485-90.
- Rijkaart DC, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Bulkman NW, Heideman DA, Kenter GG, Cuzick J, Snijders PJ, Meijer CJ. Human papillomavirus testing for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer: final results of the POBASCAM randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2012; 13(1): 78-88.
- Ripabelli G, Grasso GM, Del Riccio I, Tamburro M, Sammarco ML. Prevalence and genotype identification of human papillomavirus in women undergoing voluntary cervical cancer screening in Molise, central Italy. *Cancer Epidemiol*. 2010 Apr;34(2):162-7.
- Rohde V, Erles K, Sattler HP, Derouet H, Wullich B, Schlehofer JR. Detection of adeno-associated virus in human semen: does viral infection play a role in the pathogenesis of male infertility? *Fertil Steril* 1999; 72: 814-816.
- Rosa MI, Fachel JM, Rosa DD, Medeiros LR, Igansi CN, Bozzetti MC. Persistence and clearance of human papillomavirus infection: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol*. 2008 Dec;199(6):617.e1-7.
- Rossi PG, Baldacchini F, Ronco G. The Possible Effects on Socio-Economic Inequalities of Introducing HPV Testing as Primary Test in Cervical Cancer Screening Programs. *Front Oncol* 2014, 4: 20.
- Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*. 2000;132:365-86.
- Rutledge EA, Halbert CL, Russell DW. Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus (AAV) serotypes other than AAV type 2. *J Virol* 1998, 72: 309-319.
- Sammarco ML, Del Riccio I, Tamburro M, Grasso GM, Ripabelli G. Type-specific persistence and associated risk factors of human papillomavirus infections in women living in central Italy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013 Jun;168(2):222-6.
- Samulski RJ, Berns KI, Tan M, Muzyczka N. Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982, 79: 2077-2081.
- Sarian LOZ, Santos ALF, Derchain SFM, Figueiredo PG, Morais SS. Carga viral do Papilomavirus humano na predição da gravidade de lesões cervicais em mulheres com atipias celulares na colpocitologia oncológica. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2003, 25: 365-370.
- Schiffman M, Solomon D. Findings to date from the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS). *Arch Pathol Lab Med*. 2003 Aug;127(8):946-9.
- Schiffman M, Rodriguez AC, Chen Z, Wacholder S, Herrero R, Hildesheim A, Desalle R, Befano B, Yu K, Safaeian M, Sherman ME, Morales J, Guillen D, Alfaro M, Hutchinson M, Solomon D, Castle PE, Burk RD. Population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. *Cancer Res* 2010, 70: 3159–3169.
- Schlehofer JR, Ehrbar M, zur Hausen H. Vaccinia virus, herpes simplex virus, and carcinogens induce DNA amplification in a human cell line and support replication of a helper virus dependent parvovirus. *Virology* 1986, 152: 110-117.
- Schlehofer JR. The tumor suppressive properties of adeno-associated viruses. *Mutat Res* 1994, 305: 303-313.
- Schmidt OW, Cooney MK, Foy HM. Adeno-associated virus in adenovirus type 3 conjunctivitis. *Infect Immun* 1975, 11: 1362-1370.
- Schmidt M, Grot E, Cervenka P, Wainer S, Buck C, Chiorini JA. Identification and characterization of novel adeno-associated virus isolates in ATCC virus stocks. *J Virol* 2006, 80(10): 5082-5085.
- Schmidt M, Voutetakis A, Afione S, Zheng C, Mandikian D, Chiorini JA. Adeno-associated virus type 12 (AAV12): a novel AAV serotype with sialic acid- and heparan sulfate proteoglycan-independent transduction activity. *J Virol* 2008; 82: 1399-1406.
- Schnepp BC, Jensen RL, Chen CL, Johnson PR, Clark KR. Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J Virol* 2005, 79: 14793-14803.

- Shang Q, Wang Y, Fang Y, Wei L, Chen S, Sun Y, Li B, Zhang F, Gu H. Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 [corrected] genes and long control region in [corrected] cervical carcinomas in patients in northeast China. *J Clin Microbiol*. 2011 Jul;49(7):2656-63.
- Shields TS, Brinton LA, Burk RD, Wang SS, Weinstein SJ, Ziegler RG, Studentsov YY, McAdams M, Schiffman MA. Case-control study of risk factors for invasive cervical cancer among U.S. women exposed to oncogenic types of human papillomavirus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004, 13(10): 1574-1582.
- Sichero L, Ferreira S, Trottier H, Duarte-Franco E, Ferenczy A, Franco EL, Villa LL. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *Int J Cancer* 2007, 120: 1763-1768.
- Sichero L, Sobrinho JS, Villa LL. Oncogenic potential diverge among human papillomavirus type 16 natural variants. *Virology*. 2012 Oct 10;432(1):127-32.
- Smith J, Herrero R, Erles K, Grimm D, Muñoz N, Bosch X, Tafur L, Shah KV, Schlehofer JR. Adeno-associated virus seropositivity and HPV-induced cervical cancer in Spain and Colombia. *Int J Cancer* 2001; 94: 520-526.
- Smith JS, Herrero R, Bosetti C, Muñoz N, Bosch FX, Eluf-Neto J, Castellsagué X, Meijer CJ, Van den Brule AJ, Franceschi S, Ashley R; International Agency for Research on Cancer (IARC) Multicentric Cervical Cancer Study Group. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2002 Nov 6;94(21):1604-13.
- Spano LC, Gatti J, Nascimento JP, Leite JP. Prevalence of human cytomegalovirus infection in pregnant and non-pregnant women. *J Infect*. 2004 Apr;48(3):213-20.
- Spinillo A, Dal Bello B, Alberizzi P, Cesari S, Gardella B, Roccio M, Silini EM. Clustering patterns of human papillomavirus genotypes in multiple infections. *Virus Res* 2009, 142(1-2): 154-159.
- Srivastava A, Lusby EW, Berns KI. Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J Virol* 1983, 45: 555-564.
- Stevens MP, Garland SM, Tan JH, Quinn MA, Petersen RW, Tabrizi SN. HPV genotype prevalence in women with abnormal pap smears in Melbourne, Australia. *J Med Virol* 2009, 81(7): 1283-1291.
- Strickler HD, Viscidi R, Escoffery C, Rattray C, Kotloff KL, Goldberg J, Manns A, Rabkin C, Daniel R, Hanchard B, et al. Adeno-associated virus and development of cervical neoplasia. *J. Med. Virol* 1999; 59: 60-65.
- Stubenrauch F, Laimins LA. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol* 1999, 9: 379-386.
- Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ. AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* 1999, 5: 78-82.
- Syrjänen KJ, Syrjänen SM. Papillomavirus infections in human pathology. New York. John Wiley & Sons LTD, 2000.
- Thomson BJ, Weindler FW, Gray D, Schwaab V, Heilbronn R. Human herpesvirus 6 (HHV-6) is a helper virus for adeno-associated virus type 2 (AAV-2) and the AAV-2 rep gene homologue in HHV-6 can mediate AAV-2 DNA replication and regulate gene expression. *Virology* 1994; 204: 304-311.
- Thorner LK, Lim DA, Botchan MR. DNA-binding domain of bovine papillomavirus type 1 E1 helicase: structural and functional aspects. *J Virol* 1993, 67: 6000-6014.
- Tidy JA, Vousden KH, Farrell PJ: Relation between infection with a subtype of HPV16 and cervical neoplasia. *Lancet* 1989, 1(8649): 1225-1227.
- Tobiasch E, Rabreau M, Geletneky K, Larue-Charlus S, Severin F, Becker N. Detection of adeno-associated virus DNA in human genital tissue and in material from spontaneous abortion. *J Med Virology* 1994; 44: 215-222.
- Tobiasch F, Burguete T, Klein-Bauernschmitt P, Heilbronn R, Schlehofer JR. Discrimination between different types of human adeno-associated viruses in clinical samples by PCR. *J Virol Methods* 1998; 71: 17-25.
- Tratschin JD, Miller IL, Smith MG, Carter BJ. Adeno-associated virus vector for high frequency integration, expression, and rescue of genes in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1985, 5: 3251-3260.
- Trottier H, Franco EL. Human papillomavirus and cervical cancer: burden of illness and basis for prevention. *Am J Manag Care* 2006, v.12, p. 462-72.
- Túlio S, Pereira LA, Neves FB, Pinto AP. Association between high-risk human papillomavirus DNA load detected by hybrid capture II and high-grade precursor lesions of cervical cancer in women. *J Bras Patol Med Lab* 2007, 43(1): 31-35.
- Van Doorslaer K. Evolution of the papillomaviridae. *Virology* 2013, 445(1-2): 11-20.
- Venturoli S, Cricca M, Bonvicini F, Gallinella G, Gentilomi G, Zerbini M, Musiani M. Detection of adeno-associated virus DNA in female genital samples by PCR-ELISA. *J Med Virol*. 2001; 64: 577-582.
- Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, Franco E. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol* 2000, 81: 2959-2968.
- Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Paavonen J, Iversen OE, Olsson SE, Høye J, Steinwall M, Riis-Johannessen G, Andersson-Ellstrom A, Elfgrén K, Krogh G, Lehtinen M, Malm C, Tamms GM, Giacoletti K, Lupinacci L, Railkar R, Taddeo FJ, Bryan J, Esser MT, Singhs HL, Saah AJ, Barr E. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human

- papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *Br J Cancer* 2006, 95(11): 1459-1466.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999 Sep;189(1):12-9.
- Walters RW, Agbandje-McKenna M, Bowman VD, Moninger TO, Olson NH, Seiler M, Chiorini JA, Baker TS, Zabner J. Structure of adeno-associated virus serotype 5. *J Virol* 2004, 78(7): 3361-3371.
- Walz CM, Deprez A, Dupressoir T, Dürst M, Rabreau M, Schlehofer JR. Interaction of human papillomavirus type 16 and adeno-associated virus type 2 co-infecting human cervical epithelium. *J Gen Virol* 1997; 78: 1441-1452.
- Walz CM, Anisi TR, Schlehofer JR, Gissmann L, Schneider A, Müller M. Detection of infectious adeno-associated virus particles in human cervical biopsies. *Virology.* 1998; 247: 97-105.
- Walz CM, Nakamura M, Fukunaga T, Jasiewicz Y, Edler L, Schlehofer JR, Tanaka Y. Reduced prevalence of serum antibodies against adeno-associated virus type 2 in patients with adult T-cell leukaemia lymphoma. *J Med Virol.* 2001 Sep;65(1):185-9.
- Walz CM, Correa-Ochoa M, Müller M, Schlehofer JR. Adenoassociated virus type 2-induced inhibition of the human papillomavirus type 18 promoter in transgenic mice. *Virology* 2002; 293: 172-181.
- Wang K, Huang S, Kapoor-Munshi A, Nemerow G. Adenovirus internalization and infection require dynamin. *J Virol* 1998, 72: 3455-8.
- Weitzman MD, Kyöstiö SR, Kotin RM, Owens RA. Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91: 5808-5812.
- WHO. Human Papillomavirus Laboratory Manual, 1st edition. World Health Organization WHO, Geneva. Disponível em: <http://www.who.int/immunization/documents/WHO_IVB_10.12/en/> Acesso em: ago 2011.
- Wonderling RS, Kyöstiö SR, Owens RA. A maltose-binding protein/adeno-associated virus Rep68 fusion protein has DNA-RNA helicase and ATPase activities. *J Virol* 1995, 69: 3542-3548.
- Woodman CB, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P, Yates M, Rollason TP, Young LS. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet.* 2001 Jun 9;357(9271):1831-6.
- Wu D, Cai L, Huang M, Zheng Y, Yu J. Prevalence of genital human papillomavirus infection and genotypes among women from Fujian province, PR China. *Eur J Obst Gyn Rep Bio* 2010, 151: 86-90.
- Xi LF, Kiviat NB, Hildesheim A, Galloway DA, Wheeler CM, Ho J, Koutski LA. Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence. *J Natl Cancer Inst* 2006, 98:1045-1052.
- Xi LF, Koutski LA, Hildesheim A, Galloway DA, Wheeler CM, Winer RI. Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007, 16: 4-10.
- Xiao W, Chirmule N, Berta SC, McCullough B, Gao G, Wilson JM. Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J Virol* 1999, 73: 3994-4003.
- Yalkinoglu AO, Heilbronn R, Bürkle A, Schlehofer JR, zur Hausen H. DNA amplification of adeno-associated virus as a response to cellular genotoxic stress. *Cancer Res.* 1988; 48: 3123-3129.
- You H, Liu Y, Prasad K, Agrawal N, Zhang D, Bandyopadhyay S, Liu H, Kay HH, Mehta JL, Hermonat PL. Multiple human papillomavirus genes affect the adeno-associated virus life cycle. *Virology* 2006, 344: 532-540.
- Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res* 1998, 58(4): 829-833.
- Zhan D, Santin AD, Liu Y, Parham GP, Li C, Meyers C, Hermonat PL. Binding of the human papillomavirus type 16 p97 promoter by the adeno-associated virus rep78 major regulatory protein correlates with inhibition. *J Biol Chem* 1999, 274, 31619-31624.
- zur Hausen H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* 1991, 184: 9-13.
- zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000 May 3;92(9):690-8.
- zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002, 2: 342-350.

ANEXO A

QUESTIONÁRIO APLICADO

Número do prontuário :

Bairro/Município de Residência :

Naturalidade :

USO DE CIGARROS E DROGAS

Você fuma? 1. sim 2. Não

Quantos cigarros?

1. Irregularmente, de tempo em tempo 2. Menos de 5 cigarros por dia
3. De 5 à 20 cigarros por dia 4. Mais de de 20 cigarros por dia (mais de um maço)

Se não, você já fumou?

1. Sim, 1 ou 2 vezes 2. Sim, regularmente 3. Não, nunca
Durante a semana que passou, você bebeu alguma bebida alcoólica (cerveja, vinho, aperitivos, etc)?

1. Não 2. Uma vez 3. Várias vezes 4. Ficou bêbada

Você utiliza algum medicamento do tipo?

1. Para dormir 2. Para ansiedade e stress 3. Antidepressivos

4. Excitantes 5. Não Se sim, qual? _____

Você já utilizou algum outro tipo de droga?

1. Não 2. Cola, éter 3. Cocaina 4. Crack 5. Remédios 6. Outras _____

Você já utilizou droga injetável ?

1. Sim 2. Não 3. NR

INFORMAÇÃO CONTRACEPTIVA

Você utiliza algum método contraceptivo?

1. Pilula 2. Preservativo 3. DIU 4. Muco cervical/billings 5. Temperatura 6. Tabela
7. Diafragma 8. Pilula do dia seguinte 9. Preservativo feminino 10. Não

Você e seu parceiro utilizam preservativos ? 1. Sim 2. Não

Se sim, com que frequência vocês fazem uso do preservativo ?

1. sempre 2. Às vezes 3. Raramente 4. Nunca

HISTÓRIA SEXUAL E REPRODUTIVA

Qual era sua idade quando você teve a primeira relação sexual? |__|__| anos

Qual era a idade de seu parceiro/a? |__|__|anos

Você tem ou já teve relação sexual anal ? 1. Sim 2. Não 3. NR

Você já teve relação sexual com outra mulher ? 1. Sim 2. Não 3. NR

Em média, quantas relações você tem (ou tinha) por semana? |__|__|__|

Quantos parceiros sexuais masculinos você já teve na vida? |__|__|__|

Quantos parceiros sexuais masculinos você teve nos últimos 12 meses? |__|__|__|

Você já engravidou?

1. Nunca 2. Uma vez 3. Várias vezes

Se sim, qual era sua idade na primeira gravidez ? |__|__| anos

Número : filhos () Abortos espontâneos () Abortos provocados ()

Você está grávida? 1. sim 2. Não

SAÚDE, DST E AIDS

Qual foi a última vez que você fez exame ginecológico (preventivo) ?

Você sabe dizer se você já teve alguma doença transmitida sexualmente ? 1. Sim 2. Não

Se sim, qual ? _____ -

Como você descobriu essa doença/infecção ?

1. Seu parceiro lhe disse que estava infectado
2. Você apresentou sintomas que a levaram procurar um serviço de saúde
3. Durante uma consulta de rotina ou por outro motivo

Na ocasião dessa doença você procurou

1. Ninguém 2. Um médico/ Unidade do PSF 3. Uma farmácia 4. Serviço de DST
Você avisou a seu parceiro que você tinha uma DST ? 1. Sim 2. Não

Após o diagnóstico da DST você utilizou mais frequentemente o preservativo ?

1. Sim 2. Não

Após o diagnóstico da DST você reduziu sua atividade sexual? 1. Sim 2. Não
Você saberia dizer se seu parceiro : 1. Tem outras parceiras 2. Usa drogas 3. Já esteve preso 4.
História de DST 5. É HIV positivo 6. Outras _____
Você já fez o teste anti-HIV ? 1. Sim 2. Não Se sim, quando ? _____
1. Por iniciativa própria 2. Durante uma hospitalização 3. Durante o pré-natal
4. Durante atendimento em clínica DST 5. Em outras circunstâncias
Você tem algum dos seguintes sintomas ?
1. Dor pélvica 2. Sangramentos genitais frequentes 3. Coceiras na vagina
4. Corrimentos 5. Adenopatia inguinal (inguas na virilha) 6. Ardência ao urinar 7. Ferida
genital 8. Outras : _____

RESULTADOS EXAMES:

Citologia :

Colposcopia :


Biópsia de colo:

Captura híbrida para Chlamydia:

Captura híbrida para HPV:

Observações:

ANEXO B**APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

 UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Vitória-ES, 05 de novembro de 2009.

Da: Profa. Dr^a. Ethel Leonor Noia Maciel
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde


Para: Prof^a. Angélica Espinosa Barbosa Miranda
Pesquisadora Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado: "**Lesões cervicais precursoras de câncer colo uterino e associação com papilomavírus humano, vírus associado ao adenovírus e chlamydia trachomatis em mulheres atendidas no ambulatório de patologia cervical do hospital universitário Cassiano Antônio de Moraes**".

Senhora Pesquisadora,

Informamos a Vossa Senhoria que, o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar o Projeto de Pesquisa registrado no CEP com o nº 086/09, intitulado: "**Lesões cervicais precursoras de câncer colo uterino e associação com papilomavírus humano, vírus associado ao adenovírus e chlamydia trachomatis em mulheres atendidas no ambulatório de patologia cervical do hospital universitário Cassiano Antônio de Moraes**" e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, **APROVOU** o referido acima, em Reunião Ordinária realizada em 04 de novembro de 2009.

Gostaríamos de lembrar que cabe ao pesquisador responsável elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/96, inciso IX.2. letra "c".

Atenciosamente,


Prof^a Dr^a Ethel Leonor Noia Maciel
COORDENADORA
Comitê de Ética em Pesquisa
Centro de Ciências da Saúde/UFES

Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe – Vitória – ES – CEP 29.040-091.
Telefax: (27) 3335 7211

APÊNDICE A

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

High-grade cervical lesions among women attending a reference clinic in Brazil: associated factors and comparison among screening methods

High-grade cervical lesions in Brazil

Authors: Neide T Boldrini, MD, MSc; Luciana B Freitas, MSc; Amanda R Coutinho MD; Flavia Z Loureiro, MD; Liliana C Spano, PhD; Angelica E Miranda, MD, PhD

Authors affiliation: Post-Graduate Program in Infectious Diseases, Federal University of Espirito Santo (Universidade Federal do Espírito Santo – UFES). Vitória-Espírito Santo (ES), Brazil.

Correspondence

Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas
Av. Marechal Campos, 1468, Vitoria, ES 29040-091, Brazil
Brazil - Phone/Fax: 5527 33357504
E-mail: espinosa@ndi.ufes.br

Conflicts of Interest and Source of Funding:

There are no conflicts of interest.
Research Foundation of Espirito Santo State - FAPES (PPSUS, Grant # 45501521/2009) funded this study. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

1 **Abstract**

2 **Background:** Although screening for cervical cancer is recommended for women in most
3 countries, the incidence of cervical cancer is greater in developing countries. Our goal was to
4 determine the prevalence and factors associated with high-grade lesions/cervical cancer
5 among women attending a reference clinic in Brazil and evaluate the correlation of histology
6 with cytology, colposcopy and the high-risk HPV (HR-HPV) tests.

7 **Methods:** A cross-sectional study of women attending a colposcopy clinic was carried out.
8 The patients were interviewed to collect demographic, epidemiological and clinical data.
9 Specimens were collected for cervical cytology, *Chlamydia trachomatis* and HPV testing
10 using the Hybrid Capture (HC) and PCR tests. Colposcopy was performed for all patients
11 and biopsy for histology when cell abnormalities or cervical intraepithelial neoplasia (CIN)
12 were present.

13 **Results:** A total of 291 women participated in the study. The median age was 38 years (DIQ:
14 30-48 years). The prevalence of histologically confirmed high-grade lesions/cervical cancer
15 was 18.2% (95%, CI: 13.8%-22.6%), with 48 (16.5%) cases of CIN-2/CIN-3 and 5 (1.7%)
16 cases of invasive carcinoma. In the final logistic regression model, for ages between 30 and
17 49 years old [OR= 4.4 (95%: 1.01-19.04), history of smoking [OR= 2.4 (95%, CI: 1.14-5.18)],
18 practice of anal intercourse [OR= 2.4 (95%, CI: 1.10-5.03)] and having positive HC test for
19 HR-HPV [OR= 11.23 (95%, CI: 4 0.79-26,36)] remained independently associated with high-
20 grade lesions/cervical cancer. A total of 64.7% of the cases CIN-3\Ca in situ were related to
21 HPV-16. Non-oncogenic HPV were only found in CIN-1 biopsy results. Compared to
22 histology, the sensitivity of cytology was 31.8%, the specificity 95.5%; the sensitivity of
23 colposcopy for high-grade lesions/cervical cancer was 51.0%, specificity was 91.4% and the
24 concordance with HPV testing was high.

25 **Conclusions:** The results confirm an association of HR-HPV with precursor lesions for
26 cervical cancer. These data emphasize that cytological screening to detect precursor lesions
27 is still important in some regions and that HR-HPV should be included for screening.

28

29 **Key words:** Cervical cancer; precursor lesions; Papillomavirus; screening; Brazil.

1 INTRODUCTION

2 Although screening for cervical cancer, with varying age ranges and periodicity of
3 testing, is recommended for women in most countries, the incidence of cervical cancer and
4 its related mortality is far greater in developing countries [1][2]. The use of cytological
5 screening to detect and remove precursor lesions has had a huge impact on both the
6 incidence and mortality of cervical cancer [1][3]. However, despite the general decline in the
7 incidence of squamous cell carcinoma (SCC) in some countries where organized or
8 opportunistic cytology screening has been implemented [1][2][4][5], cervical cancer still
9 occurs [6]. This may be due to methodological limitations of screening and/or screening
10 coverage [3][7][8].

11 Persistent human papillomavirus (HPV) infection with specific high-risk (HR) HPV is
12 an indicator of high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) [9]. HPV genotyping
13 assays may be used in cytology negative, and in HPV positive women over 30 years old in
14 the same manner as HPV triage testing is currently employed in women with atypical
15 squamous cells of unknown significance (ASC-US) or borderline and mild dysplasia (BMD)
16 cytology [10]. The aim of type-specific detection of HPV is to further stratify women with
17 normal cytology who are HPV positive into different risk categories [11]. The identification of
18 infection with HR-HPV among these women justifies immediate colposcopy [11]; also women
19 with other HR-HPV infections can be managed less aggressively at lower risk [12] and
20 moreover type-specific detection provides physicians with actionable information to treat the
21 highest risk patients immediately [10].

22 Invasive cervical cancer (ICC) is the second most common cancer in women of
23 childbearing age in Brazil and about 14.1% of women in the general population are estimated
24 to be infected by cervical HPV infection at any given time [6][13]. An estimated 17,540 new
25 cases of ICC were diagnosed in Brazil in 2012 [13].

26 The best method for cervical cancer screening is still an uncertain decision in
27 developing countries. Recommendations include several possibilities from those available,
28 such as cytology, colposcopy, histology and HPV tests or even serial cytology [14][15]. In
29 Brazil, screening is performed by the tripod method - cytology followed by colposcopy and
30 biopsy for histology when abnormalities are diagnosed in cytology [13].

31 Vitoria is the capital of the state of Espírito Santo, which covers an area of
32 approximately 6,750 square miles on the southeastern coast between Rio de Janeiro and
33 Bahia in Brazil. The economy is based on steel production, ports and harbors, agriculture,
34 small industry, and tourism. The population of Espírito Santo is approximately 3.2 million,
35 with the majority living in the metropolitan area of the capital. Among the total of estimated
36 cases of ICC in Brazil, 340 cases are in Espírito Santo State and 40 in Vitoria (State
37 Capital), resulting in an incidence of 17.0, 18.7 and 20.3/100,000 women, respectively [13].

1 The goal of this study was to determine the prevalence and associated factors of
2 high-grade lesions/cervical cancer among women attending a colposcopy clinic in Vitoria,
3 Brazil. This study also evaluated the different screening methods used for this diagnosis.

4 5 **METHODS**

6 **Ethical aspects:** This study was submitted to and approved by the internal review board of
7 the *Universidade Federal do Espírito Santo* (#086/09). Written consent was given by the
8 patients for their information to be stored in the hospital database and used for research.
9 They received counseling and treatment for diagnosed cervical disorders.

10
11 **Study design:** This is a cross-sectional study of women attending a reference clinic for
12 colposcopy in a University Hospital in Vitoria, Brazil. This clinic is one of the main clinics for
13 colposcopy care in the region.

14
15 **Population:** All women attending the clinic between March and December 2011, presenting
16 incident cytological lesions, were invited to participate in the study. A 30-minutes face-to-face
17 interview was conducted with the use of a standardized questionnaire. The trained staff from
18 the local health department conducted the interviews. Enrolled patients answered the face-
19 to-face interviews which included demographic (age, schooling, marital status, family
20 income); behavioral (tobacco use, alcohol and illicit drug use), age at first sexual intercourse,
21 number of sex partners (lifetime and in the past year), types of sexual activity, frequency of
22 condom use in the last year and STI history and clinical data (previous pregnancy, age at
23 first pregnancy, number of children).

24 They also underwent a gynecological evaluation and cervical scrape samples were
25 collected for cytological analysis and the hybrid capture (HC) test for HPV and *Chlamydia*
26 *trachomatis* (CT). A colposcopy examination was performed on all patients, independently if
27 they presented cervical intraepithelial neoplasia (CIN) or not. Histological analyses were
28 performed in face of any cytological or colposcopy abnormalities as defined by the
29 Gynecology and Obstetrics Brazilian Society. Only one certified professional performed the
30 colposcopy exams using Olympus equipment, model OCS-3. Women who were pregnant,
31 presented recurrent lesions, were HIV-infected or had been admitted with a previous
32 diagnosis of invasive cervical cancer were excluded from the study.

33
34 **Laboratory procedures:** The HC test was used for the detection of high-risk and low-risk
35 genital HPV-DNA types (*digene*[®] HC2 HPV DNA Test - QIAGEN[®], Hilden, Germany) and
36 *Chlamydia trachomatis* (*digene*[®] HC for CT, QIAGEN[®], Hilden, Germany). The Qiagen test
37 for HPV includes probes for the following HR-HPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58,

1 59, 68 and low-risk HPV (LR-HPV): 6, 11, 42, 43 and 44. HPV-DNA also was investigated by
2 polymerase chain reaction (PCR), using the protocol previously established, which detects a
3 fragment of 450 bp of the L1 gene region with consensus primers MY09/11 and was followed
4 by the Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).

5
6 **Sample size calculation:** Sample size for this study was calculated to estimate the
7 prevalence of high-grade lesions or cervical cancer diagnosed by the tripod diagnosis that is
8 cytology plus colposcopy plus histology. The tripod method was considered the outcome. A
9 5% prevalence rate with confidence limits $\pm 2.5\%$ was taken as the basis for calculating the
10 sample size [16]. A total of 280 women were needed, and thus it was planned to recruit a
11 total of 322 to meet this requirement under the assumption of a 15% refusal rate.

12
13 **Statistical analyses:** Data were analyzed using the SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL)
14 statistical software program for Windows, version 17.0. A preliminary analysis was performed
15 using exploratory techniques on the data. Chi-square tests and Student's-t tests and
16 variance analysis were used. The odds ratio (OR) was used as a measure of association,
17 estimated with a 95%CI. Multivariate analysis was performed to estimate effects of
18 independent variables, through the use of logistic regression models. Variables with p value
19 ≤ 0.15 entered in the multivariate logistic regression model. Variables were considered as
20 significant when p value was ≤ 0.05 . For assessing ordinary variables we used the *chi*
21 *squared* test for trend.

22 23 **RESULTS**

24 A total of 291 women (90.7%) out of the 322 recruited were included in the study.
25 Patients excluded were: 7 (clinical invasive cancer); 5 (pregnancy); 10 (recurrent infections),
26 4 (HIV-infected), 4 (other immunosuppression conditions). The excluded patients presented
27 similar characteristics than patients included in the study.

28 The median age of women was 38 years (Interquartile range: 30-48). The prevalence
29 of high-grade lesions/cervical cancer was 18.2% (CI95%: 13.8%-22.6%), 48 (16.5%) cases
30 of high-grade lesions (CIN-2, CIN-3\carcinoma in situ) and 5 (1.7%) subclinical cases of
31 invasive cancer. The cancer cases came into the study as LSIL or HSIL and were diagnosed
32 after histology in the colposcopy clinic.

33 A total of 74 (25.4%) women had up to four years of schooling, 178 (61.2%) were
34 married and 83 (28.5%) had monthly incomes of three Brazilian minimum salaries (US\$
35 822.00) or less. Table 1 shows the demographic data; there was difference between groups
36 only regarding age ($p=0.037$).

1 Behaviors are also described in Table 1: 108 (37.1%) were smokers 11 (3.8%)
2 reported use of illicit drugs, 38 (13.1%) had first sexual intercourse before they were 15 years
3 old, 221 (75.9%) had had more than one partner in life, 220 (75.6%) reported not using
4 condoms, 90 (30.2%) reported anal sex and 46 (15.8%) previous sexually transmitted
5 infections (STI). Smokers ($p=0.042$) and anal sex practice ($p=0.003$) were more frequent
6 among women with high-grade lesions/cervical cancer.

7 Clinical data are described in Table 2. A total of 286 women were tested by HC
8 (Hybrid capture) for CT and HPV; HPV was also tested by PCR. Samples were not viable in
9 five cases but they were included in the study because they had data from the tripod method.
10 HC for *Chlamydia trachomatis* was positive in 4.9% (14/286). Having 4 or more children
11 ($p=0.030$), positive PCR for HPV ($p=0.001$) and HR-HPV in HC ($p=0.001$) were factors
12 associated to high-grade lesions/cervical cancer.

13 In the multivariate analyses, being 30-49 years old [OR=4.4 (CI 95%:1.01-19.04); a
14 tobacco user [OR=2.4 (CI95%:1.14-5.18)]; having anal sex [OR=2.4 (CI 95%:1.10-5.03)] and
15 being HR-HPV in HC [OR=11.2 (CI 95%:4.79-26.36)] were factors associated to high-grade
16 lesions/cervical cancer.

17 Table 3 describes the association between screening methods. Cytology and cytology
18 plus colposcopy presented a high rate of false negative results (94.4%) while the tripod
19 diagnosis rate was 67.4%. The inclusion of the HR-HPV improved the diagnoses of HSIL/Ca
20 in situ and ICC significantly, diagnosing all cases except one.

21 On comparing isolated tests (cytology, colposcopy and HR-HPV test) to histology, the
22 sensitivity of cytology was found to be 31.8% and the specificity 95.5%. When analyzing the
23 findings of colposcopy compared with histology results, abnormal colposcopy findings were
24 found in 90.4% of the cases of histology abnormalities and 45% of the findings of the
25 biopsies of women with normal histology. The sensitivity of colposcopy for high-grade
26 lesions/cervical cancer compared to histopathology was 51.0% and specificity was 91.4%.
27 Regarding the positivity of HPV, 55.9% of patients had a positive HPV test.

28 Among the 154 cases of DNA-HPV identified by PCR, 120 (75%) were infected by
29 high-risk genotypes. HPV-16 was identified in 35 (22.7%) from all HPV cases, followed by
30 HPV-31 in 7 (4.5%), HPV 35, 52 and 58 in 6 (3.9%), HPV-18 and 62 in 4 (2.6%), HPV-6, 26,
31 33, 53, 82 and 89 in 3 (1.9%), HPV-51, 66, 67, 73 and 84 in 2 (1.3%) and finally HPV-11, 42,
32 45, 56, 59, 61, 69, 70, 72 and 92 in 1 (0.6%). Of the 160 genotypes detectable by HC, 120
33 (75%) are HR-HPV and 40 (25%) of LR-HPV.

34 A total of 64.7% of the cases of CIN-3/Ca in situ were related to HPV-16. The non-
35 oncogenic HPV-6 and 11 were only found in CIN-1 biopsy results. Five cases were of
36 invasive carcinoma: two were positive for HPV-16, one for HPV-18, one for HPV-31 and one
37 for HPV-73.

1 DISCUSSION

2 This study reports a prevalence rate of high-grade lesions/cervical cancer of 18.2%
3 among women attending a reference clinic for colposcopy in Vitoria, Brazil. This rate is
4 higher than that reported in a Brazilian systematic review that included three large studies
5 showing a prevalence of high-grade intraepithelial lesion of 6-12% [17]. However, the present
6 study is in agreement with a study performed in a colposcopy clinic in Rio de Janeiro (19.3%)
7 [18]. Both these clinics receive patients that have been referred for abnormal cytology and
8 colposcopy as well as for treatment of precursor lesions of cervical cancer.

9 Factors associated with high-grade lesions in this study were age between 30-49
10 years old, tobacco users, anal sex practice and HR-HPV. HPV infection is described as a
11 necessary cause for ICC [19]. Although HPV-16 was the most frequent type in this study, its
12 frequency was lower than that reported in the scientific literature. Additional risk factors, in
13 part related to the host, are involved in the progression of HPV infections to carcinoma in situ
14 and cancer and they include smoking, hormonal contraceptive use, multiple pregnancies and
15 coinfection with other STI agents such as herpes simplex virus-2 (HSV) and *Chlamydia*
16 *trachomatis* [20][21][22]. Factors related to the virus, such as the HPV type involved in the
17 infection, viral variants, persistence of infection and viral load, also contribute to the
18 progression of the infection to cancer, [20][23]. The HR-HPV types are more likely to cause
19 persistent lesions and be associated with precancerous lesions. It is estimated that 70% of
20 all cervical cancers worldwide are caused by the high-risk HPV16 and 18 [24][25], with
21 prevalence rate ranges between 50 and 70% for HPV-16 [22][24].

22 There is evidence that HPV is the principal etiological agent in cervical neoplasia, and
23 some other sexually transmitted agents may either contribute to cervical carcinogenesis,
24 such as herpes simplex virus (HSV), CT and human immunodeficiency virus (HIV).
25 Epidemiological studies suggested that HSV may have a role in cervical neoplasia, but there
26 is no clear supportive experimental evidence. However, longitudinal epidemiological studies
27 have provided evidence that CT is an independent risk factor for the development of cervical
28 squamous carcinoma and this association is serotype specific. The increased risk of cervical
29 neoplasia in patients infected with HIV also has been recognized for over a decade and HIV
30 may interact with HPV either by alternating the HPV gene transcription or by
31 immunosuppression [21]. CT was not associated to HSIL or cervical cancer in the present
32 study, HSV was not included because of methodological issues and HIV infection was an
33 exclusion criteria.

34 In the present study, positive HPV tests were found in 76.9% of the patients with CIN-
35 1, 82.75% with CIN-2, 94.44% with CIN-3 or Carcinoma in situ and 100% of patients with
36 invasive carcinoma. Almost 70% of the cases with CIN-3\carcinoma in situ were related to
37 HPV-16. HPV types 6 and 11 were only found in cases of CIN-1. A study performed in Rio de

1 Janeiro reported a 50.1% prevalence of HPV, ranging from 25% among women with normal
2 cytology to 100% in women with high-grade intraepithelial lesions [26]. A similar study in
3 Venezuela showed that HPV-DNA was present in 68% of patients with low SIL, 95% with
4 high SIL and 98.7% with cervical cancer [27].

5 The distribution of HPV types differs between cervical adenocarcinoma and SCC of
6 the cervix, HPV-16 accounts for the majority of SCC, both HPV-16 and HPV18 are prominent
7 in adenocarcinoma [23][28]. However, few such cases (1.7%) were detected in the present
8 study. Another Brazilian study has also reported relatively low frequency of HPV-18 in
9 asymptomatic young women attending public schools in Rio de Janeiro [25].

10 The association of cytology, colposcopy, and histology is called the "tripod diagnosis"
11 and allows the diagnosis of neoplastic and pre-neoplastic lesions in 90% of cases [29]. This
12 is important, because in the literature, estimates of sensitivity and specificity of cervical
13 cytology in women generally have different results [3][30][31][32]. For women in general,
14 some meta-analysis studies estimated that the sensitivity of cytological approaches 55%
15 [3][33][34]. As in this study, which found a sensitivity of 31.8% and specificity of 95.5%, Fox
16 and colleagues also found low sensitivity and high specificity of cytology studying HIV-
17 infected women in Rio de Janeiro [32].

18 Although a cross-sectional study is not the best study for determining risk factors, its
19 application is justified for assessing the prevalence of and the associated factors for HR-HPV
20 among women attending the colposcopy clinic. In this study, we cannot rule out of the
21 possibility of response bias because there is always a general tendency to give socially
22 acceptable answers regarding risk factors. Nevertheless, it is important to emphasize the
23 importance of performing cervical cytological exams to monitor women's health routinely and
24 any degree of abnormality in this test should be referred for colposcopy assessment [35][36].

25 Cytology, colposcopy and histology are three important and complementary methods
26 to study the cervix and its injuries. Different findings can show discrepancies among results,
27 which can be explained by the experience of the pathologists and the resolution of the
28 colposcopy. The inclusion of HR-HPV test as a complementary test can assist in the
29 diagnosis of cervical lesions.

30 Cancer prevention programs exist and have been shown to be successful at avoiding
31 disease progression. Although this is encouraging, much work remains to identify additional
32 innovative interventions that address the social, cultural, and environmental influences of
33 HPV infection and cervical cancer. There is also a need to find better ways of disseminating
34 evidence-based approaches to cervical cancer prevention, so that effective interventions are
35 more widely used. Sexually active women need access to confidential, low-cost, and friendly
36 services to teach them how to protect themselves.

1 REFERENCES

- 2 1. Bray F, Loos AH, McCarron P, Weiderpass E, Arbyn M, Møller H, et al. (2005). Trends in cervical
3 squamous cell carcinoma incidence in 13 European countries: changing risk and the effects of
4 screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 14: 677-86.
- 5 2. Gunnell AS, Ylitalo N, Sandin S, Sparén P, Adami HO, Ripatti S. (2007). A Longitudinal Swedish
6 Study on Screening for Squamous Cell Carcinoma and Adenocarcinoma: Evidence of Effectiveness
7 and Overtreatment. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*;16(12):2641 –8
- 8 3. Arbyn M, Anttila A, Jordan J, Ronco G, Schenck U, Segnan N, et al. (2010). European guidelines
9 for quality assurance in cervical cancer screening. 2nd edition – summary document. *Ann*
10 *Oncol*;21(3):448-58.
- 11 4. Nygard JF, Skare GB, Thoresen SO. (2002). The cervical cancer screening programme in Norway,
12 1992-2000: changes in Pap smear coverage and incidence of cervical cancer. *J Med Screen*;9:86 –
13 91.
- 14 5. Soutter WP, Sasieni P, Panoskaltzis T. (2006). Long-term risk of invasive cervical cancer after
15 treatment of squamous cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*; 118: 2048 – 55.
- 16 6. WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). (2010).
17 Human Papillomavirus and Related Cancers in Brazil. Summary Report 2010. [October 20, 2013].
18 Available at www.who.int/hpvcentre.
- 19 7. Gakidou E, Nordhagen S, Obermeyer Z. (2008). Coverage of cervical cancer screening in 57
20 countries: low average levels and large inequalities. *PLoS Med*;5(6):e132.
- 21 8. Vizcaino AP, Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Barros-Dios XM, Borras J, et al. (2000). International
22 trends in incidence of cervical cancer: II. Squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer*; 86 (3):429–35.
- 23 9. Kjaer SK, Van den Brule AJ, Paull G, Svare EI, Sherman ME, Thomsen BL, et al. (2002). Type
24 specific persistence of high-risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical
25 squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *BMJ*;
26 325(7364):572.
- 27 10. Wright TC Jr, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D, et al. (2007). 2006
28 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests.
29 *Am J Obstet Gynecol*; 197: 346-355.
- 30 11. Meijer CJ, Snijders PJ, Castle PE. (2006). Clinical utility of HPV genotyping. *Gynecol*
31 *Oncol*;103:12-17.
- 32 12. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR. (2005). Elevated 10-year
33 risk of cervical pre cancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and
34 the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst*;97:1072-1079.
- 35 13. Brasil. Instituto Nacional de Câncer (INCA). (2011). Coordenação Geral de
36 Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância.
37 Estimativa 2012 :incidência de câncer no Brasil / Rio de Janeiro : Inca, 2011.
38 118 p. [October 20, 2013]. Available at www.inca.gov.br
- 39 14. Smith JS, Bosetti C, Muñoz N, Herrero R, Bosch FX, Eluf-Neto J, et al. (2004). Chlamydia
40 trachomatis and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control
41 study. *Int J Cancer*. 1;111(3):431-9.
- 42 15. Jordan J, Arbyn M, Martin-Hirsch P, Schenck U, Baldauf JJ, et al. (2008). European guidelines for
43 quality assurance in cervical cancer screening: recommendations for clinical management of abnormal
44 cervical cytology, part 1. *Cytopathology*;19(6):342-54.
- 45 16. Wang Y, Bian ML, Liu J. (2004). Comment on diagnosis of atypical squamous cells using new the
46 Bethesda System 2001 [abstract]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*.;39(1):27-9
- 47 17. Corrêa FM, Russomano FB, Oliveira CA. (2012). Colposcopic triage methods for detecting cervical
48 intraepithelial neoplasia grade 3 after cytopathological diagnosis of low-grade squamous intraepithelial
49 lesion: a systematic review on diagnostic tests. *Sao Paulo Med J*; 130(1):44-52.

- 1 18. Cytryn A, Russomano FB, Camargo MJ, Zardo LM, Horta NM, Fonseca Rde C. (2009).
2 Prevalence of cervical intraepithelial neoplasia grades II/III and cervical cancer in patients with
3 cytological diagnosis of atypical squamous cells when high-grade intraepithelial lesions (ASC-H)
4 cannot be ruled out. *Sao Paulo Med J*;127 (5):283-7.
- 5 19. ZurHausen H. (1996). Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. *Biochim*
6 *Biophys Acta*, 1288:55-78.
- 7 20. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. (2007). Human papillomavirus
8 and cervical cancer. *Lancet*, 370(9590): 890-907.
- 9 21. Al-Daraji WI, and Smith JH. (2009). Infection and Cervical Neoplasia: Facts and Fiction. *Int J Clin*
10 *Exp Pathol*; 2, 48-64
- 11 22. Castellsague X. (2008). Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer.
12 *Gynecologic Oncology* 2008, 110:S4-S7.
- 13 23. Burk RD, Terai M, Gravitt PE, Brinton LA, Kurman RJ, Barnes WA, et al. (2003). Distribution of
14 human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of
15 the cervix. *Cancer Res*; 63 (21):7215-20.
- 16 24. Lizano M, Berumen J, Garcia-Carranca A. (2009). HPV-related carcinogenesis: Basic concepts,
17 viral types and variants. *Arch Med Res*, 40:428-434
- 18 25. Oliveira LH, Ferreira MD, Augusto EF, Melgaço FG, Santos LS, Cavalcanti SM. (2010). Human
19 papillomavirus genotypes in asymptomatic young women from public schools in Rio de Janeiro, Brazil.
20 *Rev Soc Bras Med Trop*;43(1):4-8.
- 21 26. Carvalho MO, Carestiato FN, Perdigão PH, Xavier MP, Silva K, Botelho MO, et al. (2005). Human
22 papillomavirus infection in Rio de Janeiro, Brazil: a retrospective study. *Braz J Infect Dis*;9(5):398-404.
- 23 27. Correnti M, Medina F, Cavazza M E, Rennola A, Avila M, Fernández A. (2011). HPV type
24 distribution in cervical carcinoma, low-grade and high-grade squamous intraepithelial lesions in
25 Venezuela women. *Gynecol Oncol*;121(3):527-31.
- 26 28. Altekruze SF, Lacey JV Jr, Brinton LA, Gravitt PE, Silverberg SG, et al. (2003). Comparison of
27 human papillomavirus genotypes, sexual, and reproductive risk factors of cervical adenocarcinoma
28 and squamous cell carcinoma: Northeastern United States. *Am J Obstet Gynecol*;188(3):657-63.
- 29 29. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). USA. Workowski KA, Berman SM. (2010).
30 Sexually transmitted diseases treatment guideline. *MMWR recomb Rep*. 2010;55 (RR-12):74-78.
- 31 30. Cuzick J, Clavel C, Petry K, Meijer C, Hoyer H, Ratnam S, et al. (2006). Overview of the European
32 and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer*; 119:
33 1095-101.
- 34 31. Anderson J, Paramsothy P, Heilig C, Jamieson D, Shah K, et al. (2006). Accuracy of Papanicolaou test
35 among HIV-infected women. *Clin Infect Dis*; 42 (4):562-8
- 36 32. Raposo LM, Velasque L, Luz PM, Friedman RK, Cytryn A, et al. (2011). Desempenho do exame citológico
37 e da captura híbrida II no rastreamento de lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau em mulheres HIV+. *Cad*
38 *Saude Publica*; 27(7): 1281-91.
- 39 33. Cong X, Cox D, Cantor S. Bayesian meta-analysis of Papanicolaou smear accuracy. *Gynecol Oncol* 2007;
40 107:S133-7.
- 41 34. Koliopoulos G, Arbyn M, Martin-Hirsch P, Kyrgiou M, Prendiville W, Paraskevaidis E. (2007). Diagnostic
42 accuracy of human papillomavirus testing in primary cervical screening: a systematic review and meta-analysis
43 of non-randomized studies. *Gynecol Oncol*;104 (1):232-46.
- 44 35. Safaeian M, Solomon D. (2007). Cervical Cancer Prevention - Cervical Screening: Science in
45 Evolution. *Obstet Gynecol Clin North Am*; 34(4): 739.
- 46 36. Chang VT, Bean SM, Cartwright PS, Ramanujam N. (2010). Visible light optical spectroscopy is sensitive to
47 neovascularization in the dysplastic cervix. *J Biomed Opt.*; 15(5): 057006.

1 Table 1: Demographic and behavioral characteristics of women attending a colposcopy clinic in
 2 Vitória, Brazil, 2011 (N=291).
 3

Variables	High-grade lesion ¹ /cervical cancer		P value
	Positive n (%) 53 (18.2)	Negative n (%) 238 (81.8)	
Age in years			
19-29	11 (20.8)	60 (25.2)	0.037
30-49	36 (67.9)	139 (50.0)	
>=50	6 (11.3)	59 (24.8)	
Schooling in years			
0-4	16 (30.2)	58 (24.4)	0.684
5-8	13 (24.5)	61 (25.6)	
>=9	24 (45.3)	119 (50.0)	
Marital status			
Single	10 (18.9)	54 (22.7)	0.065
Married/living together	39 (73.6)	138 (58.0)	
Divorced/widow	4 (7.5)	46 (19.3)	
Monthly income			
Up to 3 BMI*	42 (79.2)	166 (69.7)	0.161
More than 3 BMI	11 (20.8)	72 (30.3)	
Smokers			
Yes	26 (49.1)	81 (34.0)	0.042
No	27 (50.9)	157 (66.0)	
Illicit drug abuse			
Yes	4 (7.6)	7 (2.9)	0.121
No	49 (92.4)	231 (97.1)	
Age at first intercourse			
<15 years	11 (20.8)	27 (11.3)	0.070
>=15 years	42 (79.2)	211 (88.7)	
# of partners/life			
More than one	45 (84.9)	176 (73.9)	0.089
Only one	8 (15.1)	62 (26.1)	
# of partners/last year			
More than one	1 (1.9)	19 (8.0)	0.140
Only one	52 (98.1)	219 (92.0)	
Condom use			
No	41 (77.4)	182 (76.5)	0.878
Yes	12 (22.6)	56 (23.5)	
Anal sex practice			
Yes	26 (49.1)	63 (26.5)	0.003
No	27 (50.9)	175 (73.5)	
Previous STI			
Yes	6 (11.3)	40 (16.8)	0.317
No	47 (88.7)	198 (83.2)	

4 *BMI= Brazilian Monthly Income in 2011=US\$274. ¹Histologically confirmed ≥ CIN-2
 5

1 Table 2: Clinical characteristics of women attending a colposcopy clinic in Vitória, Brazil, 2011
 2 (N=291).
 3

Variables	High-grade lesion/cervical cancer		P value
	Positive n (%) 53 (18.2)	Negative n (%) 238 (81.8)	
Previous pregnancy			
Yes	49 (92.5)	195 (81.9)	0.094
No	4 (7.5)	43 (18.1)	
Age at first pregnancy*			
<15 years	1 (2.0)	4 (19.7)	0.997
>=15 years	48 (98.0)	191 (80.3)	
# of children			
None	5 (9.4)	48 (20.2)	0.030
1-3 children	33 (62.3)	154 (64.7)	
>=4 children	15 (28.3)	36 (15.1)	
Chlamydia test**			
Positive	2 (3.8)	12 (5.2)	0.478
Negative	51 (96.2)	221 (94.8)	
PCR for HPV**			
Positive	47 (88.7)	112 (48.1)	0,001
Negative	6 (11.3)	121 (51.9)	
High risk HPV (HC)**			
Positive	44 (83.0)	76 (32.6)	0,001
Negative	9 (17.0)	157 (67.4)	
Low risk HPV (HC)**			
Positive	6 (11.3)	19 (8.2)	0.435
Negative	47 (88.7)	214 (91.8)	

4
 5 * Referent to 244 women who report pregnancy; ** Referent to 286 women tested by HC (Hybrid
 6 capture) for *Chlamydia trachomatis* and HPV and patients tested by PCR for HPV.
 7
 8
 9

10 Table 3: Association between tripod diagnostic and cytology, colposcopy and HR-HPV test among
 11 women attending a colposcopy clinic in Vitoria, Brazil, 2011 (N=291)

	Cervical lesions using tripod diagnosis*				Invasive Carcinoma 5 (1.7)	P value
	Negative 196 (67.4)	CIN-1 42 (14.4)	CIN-2 30 (10.3)	CIN-3/Ca in situ 18 (6.2)		
Cytology						0.590
Negative	68 (94.4)	3 (4.2)	1 (1.4)	0 (0)	0 (0)	
LSIL	124 (73.4)	23 (13.6)	14 (8.3)	7 (4.1)	1 (0.6)	
HSIL	4 (8.0)	16 (32.0)	15 (30.0)	11 (22.0)	4 (8.0)	
Cytology + colposcopy						0.328
Negative	67 (94.4)	3 (4.2)	1 (1.4)	0 (0)	0 (0)	
LSIL	122 (76.3)	22 (13.8)	12 (7.5)	4 (2.5)	0 (0)	
HSIL	7 (11.7)	17 (28.3)	17 (28.3)	14 (23.3)	5 (8.3)	
Cytology + colposcopy + HR-HPV						0.079
Negative	53 (96.4)	1 (1.8)	1 (1.8)	0 (0)	0 (0)	
LSIL	91 (86.7)	11 (10.5)	2 (1.9)	1 (1.0)	0 (0)	
HSIL	52 (39.7)	30 (22.9)	27 (20.6)	17 (13.0)	5 (3.8)	

12 * Tripod diagnostic: Cytology + Colposcopy + Histology

APÊNDICE B

Artigo publicado em 01/07/2014: doi: 10.1371/journal.pone.0100746. eCollection 2014.

PLOS ONE

Human papillomavirus 16 non-European variants are preferentially associated with high-grade cervical lesions

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PONE-D-14-06232R1
Article Type:	Research Articles
Full Title:	Human papillomavirus 16 non-European variants are preferentially associated with high-grade cervical lesions
Short Title:	HPV16 non-European variants and high-grade cervical lesions
Corresponding Author:	Luciana Bueno Freitas, MSc Federal University of Espírito Santo Vitória, Espírito Santo BRAZIL
Keywords:	HPV16; variants; cervical lesions
Abstract:	<p>HPV16 accounts for 50-70% of cervical cancer cases worldwide. Characterization of HPV16 variants previously indicated that they differ in risks for viral persistence, progression to cervical precancer and malignant cancer. The aim of this study was to examine the association of severity of disease with HPV16 variants identified in specimens (n=281) obtained from a Cervical Pathology and Colposcopy outpatient clinic in the University Hospital of Espírito Santo State, Southeastern Brazil, from April 2010 to November 2011. All cytologic and histologic diagnoses were determined prior to definitive treatment. The DNA was isolated using QIAamp DNA Mini Kit® and HPV was detected by amplification with PGMY09/11 primers and positive samples were genotyped by RFLP analyses and reverse line blot. The genomes of the HPV16 positive samples were sequenced, from which variant lineages were determined. Chi2 statistics was performed to test the association of HPV16 variants between case and control groups. The prevalence of HR-HPV types in <CIN1, CIN2 and CIN3+ were 33.7%, 84.4% and 91.6%, respectively. Thirty-eight of 49 (78%) HPV16 positive samples yielded HPV16 sequence information; of which, 32 complete genomes were sequenced and an additional 6 samples were partially sequenced. Phylogenetic analysis and patterns of variations identified 65.8% (n=25) as HPV16 European (E) and 34.2% (n=13) as non-European (NE) variants. Classification of disease into CIN3+ vs. < CIN3 indicated that NE types were associated with high-grade disease with an OR = 4.6 (1.07 - 20.2, p = 0.05). The association of HPV16 NE variants with an increased risk of CIN3+ is consistent with an HPV16 genetically determined enhanced oncogenicity. The prevalence of genetic variants of HPV16 is distributed across different geographical areas and with recent population admixture, only empiric data will provide information on the highest risk HPV16 variants within a given population.</p>
Order of Authors:	<p>Luciana Bueno Freitas, MSc</p> <p>Zigui Chen</p> <p>Elaine Muqui</p> <p>Neide Boldrini</p> <p>Angélica Miranda</p> <p>Liliana Spano</p> <p>Robert Burk</p>

1 **Human papillomavirus 16 non-European variants are preferentially associated with high-**
2 **grade cervical lesions.**

3

4 Luciana Bueno Freitas^{1,*}, Zigui Chen², Elaine Freire Muqui³, Neide Aparecida Tosato Boldrini¹,
5 Angélica Espinosa Miranda¹, Liliana Cruz Spano^{1,3}, Robert D. Burk⁴.

6

7 ¹ Post-Graduate Program in Infectious Diseases, Federal University of Espírito Santo, Brazil;

8 ² Department of Pediatrics, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York, USA;

9 ³ Department of Pathology, Center of Health Sciences, Federal University of Espírito Santo, Brazil;

10 ⁴ Departments of Pediatrics, Microbiology and Addresses Immunology, Epidemiology and

11 Population Health, and Obstetrics, Gynecology and Woman's Health, Albert Einstein College of

12 Medicine, Bronx, New York, USA.

13 * Visiting student, Department of Microbiology and Immunology, Albert Einstein College of

14 Medicine, Bronx, New York, USA.

1 ABSTRACT

2 HPV16 accounts for 50-70% of cervical cancer cases worldwide. Characterization of HPV16
3 variants previously indicated that they differ in risks for viral persistence, progression to cervical
4 precancer and malignant cancer. The aim of this study was to examine the association of severity
5 of disease with HPV16 variants identified in specimens (n=281) obtained from a Cervical
6 Pathology and Colposcopy outpatient clinic in the University Hospital of Espírito Santo State,
7 Southeastern Brazil, from April 2010 to November 2011. All cytologic and histologic diagnoses
8 were determined prior to definitive treatment. The DNA was isolated using QIAamp DNA Mini Kit®
9 and HPV was detected by amplification with PGMV09/11 primers and positive samples were
10 genotyped by RFLP analyses and reverse line blot. The genomes of the HPV16 positive samples
11 were sequenced, from which variant lineages were determined. Chi² statistics was performed to
12 test the association of HPV16 variants between case and control groups. The prevalence of HR-
13 HPV types in <CIN1, CIN2 and CIN3+ were 33.7%, 84.4% and 91.6%, respectively. Thirty-eight of
14 49 (78%) HPV16 positive samples yielded HPV16 sequence information; of which, 32 complete
15 genomes were sequenced and an additional 6 samples were partially sequenced. Phylogenetic
16 analysis and patterns of variations identified 65.8% (n=25) as HPV16 European (E) and 34.2%
17 (n=13) as non-European (NE) variants. Classification of disease into CIN3+ vs. < CIN3 indicated
18 that NE types were associated with high-grade disease with an OR = 4.6 (1.07 - 20.2, p = 0.05).
19 The association of HPV16 NE variants with an increased risk of CIN3+ is consistent with an
20 HPV16 genetically determined enhanced oncogenicity. The prevalence of genetic variants of
21 HPV16 is distributed across different geographical areas and with recent population admixture,
22 only empiric data will provide information on the highest risk HPV16 variants within a given
23 population.

1 INTRODUCTION

2 Human Papillomaviruses (HPVs) are double stranded DNA viruses with an 8 Kb episomal
3 genome. The organization of the genome is divided into three functional regions: an upstream
4 regulatory region (URR) that regulates the transcriptional and replication events; an early region
5 that expresses the non-structural proteins (e.g., E1, E2, E4, E5, E6, E7), and a late region that
6 encodes the structural proteins L1 and L2 (see [1] for review).

7 HPV belongs to the *Papillomaviridae* family, which includes more than 170 different types of
8 characterized and designated viruses [2-4] (for review see www.hpvcenter.se/html/refclones.html).
9 The papillomavirus members are classified into types based on the DNA sequence of the ORF of
10 the major capsid protein, L1. A new viral type is assigned if the complete genome is cloned and the
11 difference in the L1 nucleotide sequence is at least 10% different than all other classified HPV
12 types [2,3]. Around 40 genotypes can be identified in the anogenital region, and are associated
13 with warts, cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and cervical cancer (CC) [1,5-8].

14 According to the prevalence of specific HPV DNA types in cases of cervical cancers, the
15 anogenital HPVs have been classified into low and high risk types [9-13]. Although the etiology of
16 CC is well established, HPV infection alone is not sufficient for the cancer's development.
17 Additional risk factors are in part also related to the progression of HPV infections to carcinoma *in*
18 *situ* and cancer including smoking, hormonal contraceptive use, multiple pregnancies and possibly
19 other factors [14-18]. Factors related to the virus also contribute to progression of the infection to
20 cancer, such as HPV type involved in the infection, viral variants, persistence and viral load
21 [5,10,19,20]. Of the high-risk HPV (HR-HPV) types associated with cervical cancer, HPV16 is the
22 most prevalent and is found in approximately half of all cancers [10,12,21]. Within the PV research
23 community, isolates of the same HPV type are referred to as variants or subtypes when the
24 nucleotide sequences of the L1 ORF differ by less than 10% [22]. Significant differences in

1 pathogenicity exist between variants within a single HPV genotype and have been elucidated most
2 clearly for HPV16, whose variants differ in their association with CC, viral persistence and
3 frequency of recurrence of cervical disease [23-35, see [22] for review].

4 The description and understanding of HPV genome variants is an important area for
5 molecular pathogenesis and for the development of molecular diagnostics for HPV, vaccines and
6 other therapeutic approaches to control and/or eliminate virus-induced diseases. The
7 tumorigenicity of different HPV variants could be different between geographical areas because of
8 population history and host genetics, such as the difference in the distribution of HLA in the
9 population [27,36]. However, few studies from Brazil have reported on the prevalence of HPV DNA
10 in the genital tract and natural history of infections, especially associating phylogenetic variants in
11 the population with the severity of intraepithelial lesions [37-43].

12 As has been demonstrated by biochemical and biological differences of HPV16 variants and
13 their oncogenic potential changes [22,37,44,45], the description of oncogenic variants of HPV
14 types should contribute to understanding the genetic determinants related to development of high-
15 grade lesions and the incidence of CC in specific populations.

16

17 **MATERIALS AND METHODS**

18 Cervical smears (n=281) were obtained during gynecological visits at the Colposcopy
19 outpatient clinic in the University Hospital "Cassiano Antonio Moraes" (HUCAM) in Vitória,
20 Southeastern Brazil, from April 2010 to November 2011. This research obtained approval by the
21 Ethical Research Council of the Center of Health Sciences of the Federal University of Espírito
22 Santo, Brazil, in November 2009; all the participants signed an informed consent.

23 All cytologic and histologic diagnoses were determined prior to definitive treatment and were
24 classified as <CIN3 (normal, CIN 1, 2), n=257, used as the comparison or control group, and

1 CIN3+ (CIN3 or worse), n=24, the case group for this study. The classification in control (<CIN3) or
2 case (CIN3+) group was used in the context of the HPV16 variants results. The DNA was isolated
3 using QIAamp DNA Mini Kit[®] (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions.
4 The HPV DNA was detected by amplification with PGMY09/11 primers [46]. HPV positive samples
5 were genotyped by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) from gel analyses [47] and
6 by Reverse Line Blot Hybridization (RLB) [48]. The genomes of the HPV16 positive samples were
7 further characterized for the current study by amplifying the complete genome (~ 8 Kb) using
8 nested PCR of 3 or 4 overlapping fragments employing type-specific primer sets (available from
9 authors) as described [49]. For overlapping PCR, an equal mixture of *AmpliTaq* Gold DNA
10 polymerase (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) and *Platinum Taq* DNA Polymerase (Invitrogen,
11 Carlsbad, CA) were utilized as previously described [50].

12 The PCR product sizes were confirmed by gel electrophoresis, purified using the QuickStep
13 2 PCR Purification kit (Edge BioSystems, Gaithersburg, MD) or QIAquick Gel Extraction kit
14 (Qiagen, Valencia, CA). The amplified fragments were directly sequenced on an ABI Prism Model
15 377 automated sequencer (Perkin-Elmer Applied Biosystems) in the Einstein DNA Sequencing
16 Core Facility (Bronx, NY). The sequences of the fragments obtained were assembled using
17 Geneious v6.1.6 [51], and aligned using MAFFT v6.903b [52], together with HPV16 reference
18 sequences of each sublineage (Table S1). The construction of the phylogenetic tree inferred from
19 the aligned sequences was performed using the software PhyML [53]. Chi² statistics was
20 performed to test the association of HPV16 variants between case and control groups.

21

22 **RESULTS**

23 The median age of participating women was 38.7 years (SD 10.97). Out of 281 samples,
24 56% (157/281) were positive for HPV DNA. All of these positive samples were genotyped by RFLP

1 and RLB and HR-HPV was found in 124 samples (79%, 124/157), from which 32.3% (49/124)
2 were positive for HPV16. Based on cytology results, HR-HPV types were detected in 33.7%
3 (76/225) from <CIN1, in 84.4% (27/32) from CIN2 and in 91.6% (22/24) from CIN3+. HPV16 was
4 found in 14% (35/257) and 58% (14/24) of the samples classified as <CIN3 and CIN3+,
5 respectively ($p < 0.001$).

6 The HPV16 complete genome was characterized for 32 samples and partial genome
7 information was obtained for 6 using HPV16 specific overlapping PCR [49]. The nucleotide
8 sequences obtained for all 38 samples were compared with the HPV16 prototype of each HPV16
9 variant lineage and sublineage and based on the phylogeny, variants were assigned to a specific
10 lineage (Figure 1). Phylogenetic analysis classified 65.8% of the samples as HPV16 European (E,
11 A lineage) ($n=25$) and 34.2% as non-European (NE, lineages B, C, and D) ($n=13$) variants. Isolates
12 of the E group / A lineage were further classified to sublineages A1 (60.5%, 23/38) and A2 (5.3%,
13 2/38), and isolates from the NE group / lineages B/C/D sorted to sublineages B1 (Af-1) (2.6%,
14 1/38), C1 (Af-2) (18.4%, 7/38), and D3 (AA1) (13.2%, 5/38) (see Figure 1). Taken together,
15 samples containing HPV16 NE variants were associated with high-grade disease (CIN3+) with an
16 OR = 4.6 (95% CI: 1.07- 20.2; $p = 0.05$) compared to those with HPV16 E variants (Table 1). The
17 nucleotide differences amongst the sequenced genomes are shown in Figure S1. The T/G
18 variation at nucleotide 350 (gene *E6*) was not associated with CIN3+ (Figure S1).

19

20 **DISCUSSION**

21 Based on complete and partial genome analyses, this study described the association of
22 non-European HPV16 variants lineages/sublineages in women from Vitoria Brazil with CIN3+
23 cervical lesions. There is a proposed hypothesis about the differences in pathogenicity existing

1 among variants of a single HPV genotype [22,28]. Studies have demonstrated that HPV16 variants
2 differ in their association with CC [24,25,28,54-56] and viral persistence [23,26,29,30,32].

3 The prevalence of molecular variants from each branch in different geographical areas
4 varies significantly and correlates with the intrinsic admixture level of each population [49,57,58].
5 An increased risk of developing high-grade CIN / cancer was observed in association of HPV16
6 non-European variants in several studies in the world [22,32,45,59-63]. In addition, a number of
7 reports in Brazil have described the presence of HPV16 variants in cervical samples and/or in
8 association with different grades of lesions [37-43].

9 All sequenced HPV16 genomes showed at least one specific nucleotide variation compared
10 to the HPV16-E prototype sequence. Regarding HPV16 sublineages, defined as containing 0.5 -
11 1% of nucleotide variations, the described population had a relatively heterogeneous set of HPV16
12 variants found in the following frequency order: A1 > Af-2 > AA > A2 > Af-1. A study conducted
13 with cervical samples from Central Brazil, identified AA variants as the second most common
14 lineage of HPV16, with samples from the E branch being most common [38]. It was described
15 AA/NA variants in cases from cervical cancer in South/Central America in association with high
16 grade cervical lesions which might be related to differences in transcriptional activity, that were
17 higher than E isolate variants [60]. This feature might be one possible explanation for the
18 association between the NE variants in CIN3+ cases in the present study. The HPV16 C lineage
19 (Af-2) was the second most common variants in the current report, but due to the limited sample
20 size it is not possible to ascribe specific risks to sublineages, nevertheless 3/12 cases had C
21 lineage isolates vs. 4/26 controls; and 3/12 cases had D lineage isolates vs. 2/26 controls. Studies
22 conducted in Central or Southeastern Brazil have not found the HPV16 Af variants or it was
23 identified infrequently [37,38]; which, has been detected relatively commonly in Argentinean
24 Indians [64]. The difference in geographic distribution of HPV16 variants is likely related to the

1 population history of the region reflecting the influx of Europeans, Indian/native populations and
2 people of African descent. Similar results of geographic origins have been reported and were the
3 basis to suggest that HPV16 variants reflect relatively recent human migration patterns (see [65]
4 for review).

5 In the present study it was found that HPV16 NE variants were significantly associated with
6 CIN3 or worse lesions. Another study, with women from Northern Brazil found NE variants
7 associated with high-grade cervical lesions [42]. However, HPV16 NE variants were detected at
8 similar frequencies in low grade lesions (6/41, 14.6%) and in high grade cases (4/41, 9.7%) in a
9 study conducted in São Paulo, also in Southeastern Brazil [39] and HPV16 NE and E variants
10 have been detected at similar frequencies among the cytological finds (atypical squamous or
11 glandular cells of undetermined significance, cytological alterations suggesting HPV infection, CIN,
12 squamous cell carcinoma, and adenocarcinoma) in women from Central Brazil [38], not supporting
13 a role for NE HPV16 variants as at increased risk for CC. Nevertheless, there is other evidence
14 that HPV16 NE variants have elevated risks for CIN3 and cancer, although much of the effect was
15 related to the increased risk with the AA (D) lineage [25,56,66], and there appears to be
16 geographic complexity [58]. There are also reports that indicate the HPV16 AA (D) lineage
17 compared to the E (A) lineage is disproportionately (4–35 fold increased) associated with
18 adenocarcinoma (AdCa) vs. squamous cell carcinoma (SCC) [25,56,67,68]. The differences in
19 studies probably relates to the level of admixture of different HPV16 variants within a population.

20 The nucleotide substitutions in the samples from the lineage A have not shown any
21 association with the cases, corroborating the negative association of the E variants with high-grade
22 lesions. On the other hand, the SNPs detected along the complete genome from the NE variants
23 are highly correlated and it is difficult to identify specific SNPs that might have unique pathologic
24 consequences. The frequency of the Af-2 variants and AA in the NE branch could reflect the

1 admixture of the population studied. The substitutions in the URR region can affect the
2 transcription binding sites including activator protein 1 (AP1), nuclear factor 1 (NF1), octamer-
3 binding protein 1 (Oct1), glucocorticoid/progesterone response element (GRE), specificity protein 1
4 (SP1), transcription enhancer factor 1 (TEF1), and yin yang 1 (YY1) [69,70]. The substitution
5 observed in the NE samples (A7458T), but not in the E samples, can affect the NF1 binding site
6 and the ACCN₆GGT sequence recognized by the E2 protein in the URR region [71] which could be
7 also related to the oncogenicity. The nucleotide alterations at the position of the transcriptional
8 factors binding site (TFBS) could reflect in the HPV replication, and consequently in the
9 malignancy induction in the cervix. Some point mutation could be observed at the binding sites
10 TEF-1 (G7193T, C7689A), GRE-1 (A7458T, A7485C, G7489A) and YY1 (G7521A, C7786T,
11 G7826A, A7837C, A7839G). One of the changes, as C7689A (TEF1 site), was found in NE
12 samples significantly associated with cases. In a previous study, Kämmer et al. [69] observed that
13 nucleotide variations, although not inside the TFBS, but located adjacent to them, were probably
14 responsible for the increase of 3.9-fold on the transcriptional activity of P97 promoter. Accordingly,
15 besides the mutations located in the binding sites it was found in our study some adjacent
16 nucleotide alterations that could alter the function of the mentioned transcriptional factors. HPV
17 isolates from cervical cancer show frequent point mutations or deletions at YY1 binding sites on
18 the LCR, which may be responsible for the increase of the transcriptional activity observed for
19 these isolates [72,73]. However with the small numbers of cases, the present study cannot confirm
20 the relation of the TFBS with the cervical lesions grade.

21 Increasing studies performed around the world, including Brazil, indicate the relationship
22 between HPV16 variants and higher oncogenic risk is complex [74,75], thus a well-planned
23 epidemiological study is needed to evaluate HPV16 single nucleotide polymorphisms and
24 oncogenic risk. For example, there is a relatively common SNP with the E6 ORF (T350G), which is

1 a non-synonymous change resulting in an amino acid variation (L83V). This variation/mutation
2 might be related to higher oncogenic potential [23,24,76,77], or not [33,78,79]; in the current study
3 it was not found to be associated with increased risk. It has been suggested that this mutation is
4 associated with CC in a heterogenic form by world region [58]. The E variants harboring the 350T
5 were significantly associated with the cancer risk in comparison with those with the mutation 350G
6 in samples from Europe/Central Asia and East Asia, while the opposite was true in South/Central
7 America [80]. A similar strong association of EUR-350G with cervical cancer has been observed in
8 previous studies from Argentina [81] and Morocco [45].

9 Moreover, miss-sense nucleotide mutations theoretically could alter the epitopes targeted by
10 the current HPV vaccine [82]. The investigation of circulating HPV variants is important not just in
11 the light of the viral and concomitant viral evolution, but also in understanding the pathogenesis of
12 HPV in malignant lesions. It will also be important to follow vaccinated populations to establish
13 whether the oncogenic HPV genomes might have greater mutational variability and/or ability to
14 mutate than has currently been documented. It is not thought that the oncogenic HPV types will be
15 able to evade the current vaccines, but only empirical evidence will allow this question to be
16 addressed in the decades to come.

17 The association of HPV16 non-European variants with CIN3+ is consistent with a
18 genetically determined enhanced oncogenic potential of the NE HPV16. These observations
19 suggest that determination of HPV16 variant lineage has clinical implications. The complete
20 genome sequencing has the goal of allowing the genetics of HPV16 to inform us about differences
21 in HPV biology, and permit continued improvements in phylogenic classification of subgroups with
22 even higher oncogenic risks.

1 The prevalence of genetic variants of HPV16 is distributed across different geographical
2 areas and with recent population admixture, Brazil is an ideal location to study the biology and
3 clinical importance of HPV variants.

4

5 **ACKNOWLEDGEMENTS**

6 We want to acknowledge Dra María Alejandra Picconi and Jorge Basiletti (Oncogenic Virus
7 Service, National Institute of Infectious Diseases (INEI) – ANLIS “Dr. Malbrán”, Argentina) for the
8 donation of the membrane used for the hybridization and for the kindness dispensed in the lab
9 training of LBF.

10

11 **Conflict of Interest**

12 Dr Robert D. Burk is one of the co-authors and he is a PLOS ONE Editorial Board member,
13 however this does not alter our adherence to PLOS ONE Editorial policies and criteria.

1 REFERENCES

- 2 1. zur Hausen H. (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application.
3 Nat Rev Cancer 2: 342-350.
- 4 2. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. (2004) Classification of
5 papillomaviruses. Virology 324: 17-27.
- 6 3. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, et al. (2010) Classification of
7 papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. Virology
8 401: 70-79.
- 9 4. de Villiers EM. (2013) Cross-roads in the classification of papillomaviruses. Virology, 445: 2-10.
- 10 5. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. (2007) Human papillomavirus
11 and cervical cancer. Lancet 370: 890-907.
- 12 6. Schiffman M, Clifford G, Buonaguro FM. (2009) Classification of weakly carcinogenic human
13 papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. Infect Agent Cancer
14 4: 8.
- 15 7. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, et al. (2010) Human
16 papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional
17 worldwide study. Lancet Oncol 11: 1048-1056.
- 18 8. Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, de Sanjosé S, et al. (2012) Human papillomavirus types
19 in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. Int J Cancer
20 131: 2349-2359.

- 1 9. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, et al. (2003) Epidemiologic
2 classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348:
3 518-527.
- 4 10. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, et al. (2007) Human papillomavirus type
5 distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int*
6 *J Cancer* 121: 621-632.
- 7 11. Castellsagué X. (2008) Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer.
8 *Gynecol Oncol* 110: S4-7.
- 9 12. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJF, Clifford GM. (2011) Human papillomavirus
10 type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region,
11 histological type and year of publication. *Int J Cancer* 128: 927-935.
- 12 13. Cubie HA. (2013) Diseases associated with human papillomavirus infection. *Virology* 445: 21-
13 34.
- 14 14. Hildesheim A, Wang SS. (2002) Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review.
15 *Virus Res* 89: 229-240.
- 16 15. Castellsague X, Munoz N. (2003) Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus
17 carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst*
18 *Monogr* 31: 20-28.
- 19 16. Smith JS, Bosetti C, Muñoz N, Herrero R, Bosch FX, et al. (2004) Chlamydia trachomatis and
20 invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. *Int J Can*
21 *111*: 431-439.

- 1 17. Vaccarella S, Herrero R, Snijders PJF, Dai M, Thomas JO, et al. (2008) Smoking and human
2 papillomavirus infection: pooled analysis of the International Agency for Research on Cancer HPV
3 Prevalence Surveys. *Int J Epidemiol* 37: 536-546.
- 4 18. Roura E, Castellsague X, Pawlita M, Travier N, Waterboer T, et al. (2013) Smoking as a major
5 risk factor for cervical cancer and pre-cancer: results from the EPIC cohort. *Int J Cancer* doi:
6 10.1002/ijc.28666.
- 7 19. Rumbold AR, Tan SE, Condon JR, Taylor-Thomson D, Nickels M, et al. (2012) Investigating a
8 cluster of vulvar cancer in young women: a cross-sectional study of genital human papillomavirus
9 prevalence. *BMC Infect Dis* 12: 243.
- 10 20. Winer RL, Xi LF, Shen Z, Stern JE, Newman L, et al. (2013) Viral load and short-term natural
11 history of type-specific oncogenic human papillomavirus infections in a high-risk cohort of midadult
12 women. *Int J Can* doi:10.1002/ijc.28509.
- 13 21. Bzhalava D, Guan P, Franceschi S, Dillner J, Clifford G. (2013) A systematic review of the
14 prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. *Virology* 445: 224-231.
- 15 22. Burk RD, Harari A, Chen Z. (2013) Human papillomavirus genome variants. *Virology* 445: 232-
16 243.
- 17 23. Londesborough P, Ho L, Terry G, Cuzick J, Wheeler C, et al. (1996) Human papillomavirus
18 genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with
19 minor cervical abnormalities. *Int J Cancer* 69: 364-368.
- 20 24. Zehbe I, Voglino G, Delius H, Wilander E, Tommasino M. (1998) Risk of cervical cancer and
21 geographical variations of human papillomavirus 16 E6 polymorphisms. *Lancet* 352: 1441-1442.

- 1 25. Berumen J, Ordonez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, et al. (2001) Asian-American
2 variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl*
3 *Cancer Inst* 93: 1325-1330.
- 4 26. Ferenczy A, Franco E. (2002) Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia.
5 *Lancet Oncol* 3: 11-16.
- 6 27. Xi LF, Kiviat NB, Hildesheim A, Galloway DA, Wheeler CM, et al. (2006) Human papillomavirus
7 type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence. *J Natl Cancer Inst* 98: 1045-
8 1052.
- 9 28. Xi LF, Koutsky LA, Hildesheim A, Galloway DA, Wheeler CM, et al. (2007) Risk for high-grade
10 cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18.
11 *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16: 4-10.
- 12 29. Sichero L, Ferreira S, Trottier H, Duarte-Franco E, Ferenczy A, et al. (2007) High grade
13 cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *Int J*
14 *Cancer* 120: 1763-1768.
- 15 30. Lee K, Magalhaes I, Clavel C, Birembaut P, Tommasino M, et al. (2008) Distribution of human
16 papillomavirus 16 E6, L1, L2 and E2 gene variants in pre-malignant cervical disease. *Virus Res*
17 131: 106-110.
- 18 31. Wheeler MC. (2008) Natural history of human papillomavirus infections, cytologic and
19 histologic abnormalities, and cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am* 35: 519-536.
- 20 32. Schiffman M, Rodriguez AC, Chen Z, Wacholder S, Herrero R, et al. (2010) A population-
21 based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence,
22 and cervical neoplasia. *Cancer Res* 70: 3159-3169.

- 1 33. Sabol I, Matovina M, Si-Mohamed A, Grce M. (2012) Characterization and whole genome
2 analysis of human papillomavirus type 16 e1-1374^{63nt} variants. PLoS One 7: e41045.
- 3 34. Bernard E, Pons-Salort M, Favre M, Heard I, Delarocque-Astagneau E, et al. (2013)
4 Comparing human papillomavirus prevalences in women with normal cytology or invasive cervical
5 cancer to rank genotypes according to their oncogenic potential: a meta-analysis of observational
6 studies. BMC Infect Dis 13: 373.
- 7 35. Cornet I, Gheit T, Clifford GM, Combes JD, Dalstein V, et al. (2013) Human papillomavirus type
8 16 E6 variants in France and risk of viral persistence. Infect Agent Cancer 8:4-8.
- 9 36. de Araujo Souza PS, Sichero L, Maciag PC. (2009) HPV variants and HLA polymorphisms: the
10 role of variability on the risk of cervical cancer. Future Oncol 5: 359-370.
- 11 37. Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, et al. (2000) Molecular variants of
12 human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. J Gen
13 Virol 81: 2959-2968.
- 14 38. Cruz MR, Cerqueira DM, Cruz WB, Camara GN, Brígido MM, et al. (2004) Prevalence of
15 human papillomavirus type 16 variants in the Federal District, Central Brazil. Mem Ins. Oswaldo
16 Cruz 99: 281-282.
- 17 39. Gheit T, Simoes RT, Tommasino M, Donadi EA, Gonçalves MA. (2006) HPV16 variants in
18 squamous intraepithelial lesions in human immunodeficiency virus-negative and -positive Brazilian
19 women. Viral Immunol 19: 340-345.
- 20 40. Rabelo-Santos SH, Villa LL, Derchain SF, Ferreira S, Sarian LO, et al. (2006) Variants of
21 human papillomavirus types 16 and 18: histological findings in women referred for atypical
22 glandular cells or adenocarcinoma in situ in cervical smear Int J Gynecol Pathol 25: 393-397.

- 1 41. Alencar TR, Cerqueira DM, Cruz MR, Wyant PS, Ramalho ED, et al. (2007) New HPV-16
2 European and non-European variants in Central Brazil. *Virus Genes* 35:1-4.
- 3 42. Junes-Gill K, Sichero L, Maciag PC, Mello W, Noronha V, et al. (2008) Human papillomavirus
4 type 16 variants in cervical cancer from an admixed population in Brazil. *J Med Virol* 80: 1639-
5 1645.
- 6 43. Castro MM, Farias IP, Borborema-Santos CM, Correia G, Astolfi-Filho S. (2011) Prevalence of
7 human papillomavirus (HPV) type 16 variants and rare HPV types in the central Amazon region.
8 *Genet Mol Res* 10:186-196.
- 9 44. Pande S, Jain N, Prusty BK, Bhambhani S, Gupta S, et al. (2008) Human papillomavirus type
10 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in biopsy samples from
11 cervical cancer patients in North India. *J Clin Microbiol* 46: 1060-1066.
- 12 45. Qmichou Z, Khyatti M, Berraho M, Ennaji MM, Benbacer L, et al. (2013) Analysis of mutations
13 in the E6 oncogene of human papillomavirus 16 in cervical cancer isolates from Moroccan women.
14 *BMC Infect Dis* 13: 378.
- 15 46. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, et al. (2000) Improved amplification
16 of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 38: 357-361.
- 17 47. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, et al. (1994) Identification and
18 assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction
19 amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic
20 algorithms. *J Infect Dis* 170: 1077-1085.
- 21 48. Estrade C, Menoud PA, Nardelli-Haefliger D, Sahli R. (2011) Validation of a low-cost human
22 papillomavirus genotyping assay based on PGMY PCR and reverse blotting hybridization with
23 reusable membranes. *J Clin Microbiol* 49: 3474-3481.

- 1 49. Chen Z, Schiffman M, Herrero R, DeSalle R, Anastos K, et al. (2011) Evolution and Taxonomic
2 Classification of Human Papillomavirus 16 (HPV16)-Related Variant Genomes: HPV31, HPV33,
3 HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. PLoS ONE 6: e20183.
- 4 50. Terai M, Burk RD. (2001) Characterization of a novel genital human papillomavirus by
5 overlapping PCR: candHPV86 identified in cervicovaginal cells of a woman with cervical neoplasia.
6 J Gen Virol 82: 2035-2040.
- 7 51. Rozen S, Skaletsky HJ. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist
8 programmers. Methods Mol Biol 132: 365-386.
- 9 52. Katoh K, Toh H. (2010) Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program.
10 Bioinformatics 26: 1899-1900.
- 11 53. Guindon S, Gascuel O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large
12 phylogenies by maximum likelihood. Syst Biol 52: 696-704.
- 13 54. Xi LF, Demers GW, Koutsky LA, Kiviat NB, Kuypers J, et al. (1995) Analysis of human
14 papillomavirus type 16 variants indicates establishment of persistent infection. J Infect Dis 172:
15 747-755.
- 16 55. Zehbe I, Tachezy R, Mytilineos J, Voglino G, Mikyskova I, et al. (2001) Human papillomavirus
17 16 E6 polymorphisms in cervical lesions from different European populations and their correlation
18 with human leukocyte antigen class II haplotypes. Int J Cancer 94: 711-716.
- 19 56. Burk RD, Terai M, Gravitt PE, Brinton LA, Kurman RJ, et al. (2003) Distribution of human
20 papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the
21 cervix. Cancer Res 63: 7215-7220.
- 22 57. Sichero L, Villa LL. (2006) Epidemiological and functional implications of molecular variants of
23 human papillomavirus. Braz J Med Biol Res 39: 707-717.

- 1 58. Cornet I, Gheit T, Iannacone MR, Vignat J, Sylla BS, et al. (2013) HPV16 genetic variation and
2 the development of cervical cancer worldwide. *Br J Cancer* 108: 240-244.
- 3 59. KrennHrubec K, Mrad K, Sriha B, Ben Ayed F, Bottalico DM, et al. (2011) HPV types and
4 variants among cervical cancer tumors in three regions of Tunisia. *J Med Virol* 83: 651-657.
- 5 60. Sichero L, Sobrinho JS, Villa LL. (2012) Oncogenic potential diverge among human
6 papillomavirus type 16 natural variants. *Virology* 432: 127-132.
- 7 61. Chang YJ, Chen HC, Pan MH, Lee BH, You SL, et al. (2013) Intratypic variants of human
8 papillomavirus type 16 and risk of cervical neoplasia in Taiwan. *J Med Virol* 85:1567-1576.
- 9 62. Mendoza L, Picconi MA, Mirazo S, Mongelós P, Giménez G, et al. (2013) Distribution of HPV-
10 16 variants among isolates from Paraguayan women with different grades of cervical lesion *Int J*
11 *Gynaecol Obstet* 122: 44-47.
- 12 63. Pientong C, Wongwarissara P, Ekalaksananan T, Swangphon P, Kleebkaow P, et al. (2013)
13 Association of human papillomavirus type 16 long control region mutation and cervical cancer.
14 *Viol J* 10: 30.
- 15 64. Tonon SA, Basiletti J, Badano I, Alonio LV, Villa LL, et al. (2007) Human papillomavirus type
16 16 molecular variants in Guarani Indian women from Misiones, Argentina. *Int J Infect Dis* 11: 76-81.
- 17 65. Bernard HU. (2013) Taxonomy and phylogeny of papillomaviruses: an overview and recent
18 developments. *Infect Genet Evol* 18: 357-361.
- 19 66. Zuna RE, Moore WE, Shanesmith RP, Dunn ST, Wang SS, et al. (2009) Association of HPV16
20 E6 variants with diagnostic severity in cervical cytology samples of 354 women in a US population.
21 *Int J Cancer* 125: 2609-2613.

- 1 67. Quint KD, de Koning MN, van Doorn LJ, Quint WG, Pirog EC. (2010) HPV genotyping and
2 HPV16 variant analysis in glandular and squamous neoplastic lesions of the uterine cervix.
3 *Gynecol Oncol* 117: 297-301.
- 4 68. Zuna RE, Tuller E, Wentzensen N, Mathews C, Allen RA, et al. (2011) HPV16 variant lineage,
5 clinical stage, and survival in women with invasive cervical cancer. *Infect Agent Cancer* 6: 19.
- 6 69. Kämmer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, Wheeler CM, Pfister H. (2000) Sequence analysis
7 of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences
8 for P97 promoter activity. *J Gen Virol* 81: 1975-1981.
- 9 70. Mazumder Indra D, Singh RK, Mitra S, Dutta S, Chakraborty C, et al. (2011) Genetic and
10 epigenetic changes of HPV16 in cervical cancer differentially regulate E6/E7 expression and
11 associate with disease progression. *Gynecol Oncol* 123: 597-604.
- 12 71. Vosa L., Sudakov A, Remm M, Ustav M, Kurg R. (2012) Identification and analysis of
13 papillomavirus E2 protein binding sites in the human genome. *J. Virol* 86, 348-357.
- 14 72. Dong XP, Stubenrauch F, Beyer-Finkler E, Pfister H. (1994) Prevalence of deletions of YY1-
15 binding sites in episomal HPV 16 DNA from cervical cancers. *Int J Cancer* 58: 803-808.
- 16 73. May M, Dong XP, Beyer-Finkler E, Stubenrauch F, Fuchs PG, et al. (1994) The E6/E7
17 promoter of extrachromosomal HPV16 DNA in cervical cancers escapes from cellular repression
18 by mutation of target sequences for YY1. *EMBO J* 13: 1460-1466.
- 19 74. Chimeddorj B, Pak CY, Damdin A, Okamoto N, Miyagi Y. (2008) Distribution of HPV-16
20 intratypic variants among women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical
21 cancer in Mongolia. *Asian Pacific J Cancer Prev* 9: 563-568.
- 22 75. Tsakogiannis D, Darmis F, Gortsilas P, Ruether IG, Kyriakopoulou Z, et al. (2014) Nucleotide
23 polymorphisms of the human papillomavirus 16 E1 gene. *Arch Virol* 159: 51-63.

- 1 76. Andersson S, Alemi M, Rylander E, Strand A, Larsson B, et al. (2000) Uneven distribution of
 2 HPV 16 E6 prototype and variant (L83V) oncoprotein in cervical neoplastic lesions. *Br J Cancer*
 3 83: 307-310.
- 4 77. Gheit T, Cornet I, Clifford GM, Iftner T, Munk C, et al. (2011) Risks for persistence and
 5 progression by human papillomavirus type 16 variant lineages among a population-based sample
 6 of Danish women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20: 1315-1321.
- 7 78. Bogovac Z, Lunar MM, Kocjan BJ, Seme K, Jancar N, et al. (2011) Prevalence of HPV 16
 8 genomic variant carrying a 63 bp duplicated sequence within the E1 gene in Slovenian women.
 9 *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* 20: 135-139.
- 10 79. Sabol I, Matovina M, Gasperov N, Grce M (2008) Identification of a novel human
 11 papillomavirus type 16 e1 gene variant with potentially reduced oncogenicity. *J Med Virol* 80: 2134-
 12 2140.
- 13 80. Cornet I, Gheit T, Franceschi S, Vignat J, Burk RD, et al. (2012) Human papillomavirus type 16
 14 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR. *J Virol* 86: 6855-6861.
- 15 81. Picconi MA, Alonio LV, Sichero L, Mbayed V, Villa LL, et al. (2003) Human papillomavirus type-
 16 16 variants in Quechua aboriginals from Argentina. *J Med Virol* 69: 546-552.
- 17 82. Ahmed AI, Bissett SL, Beddows S. (2013) Amino acid sequence diversity of the major human
 18 papillomavirus capsid protein: Implications for current and next generation vaccines. *Infect Genet*
 19 *Evol* 18: 151-159.

TABLES

Table 1. HPV16 variant distribution by diagnostic category.

Cytology	HPV16		Total
	E	NE	
< CIN3	20	06	26
CIN3 +	05	07	12
Total	25	13	38

< CIN3: control group, comprising the normal and cervical intraepithelial neoplasia (CIN) grades 1 and 2;
 CIN3 +: case group, comprising the samples from CIN 3 or worse (cervical cancer in situ or invasive);
 E: HPV16 European variant; NE: HPV16 non-European variant.

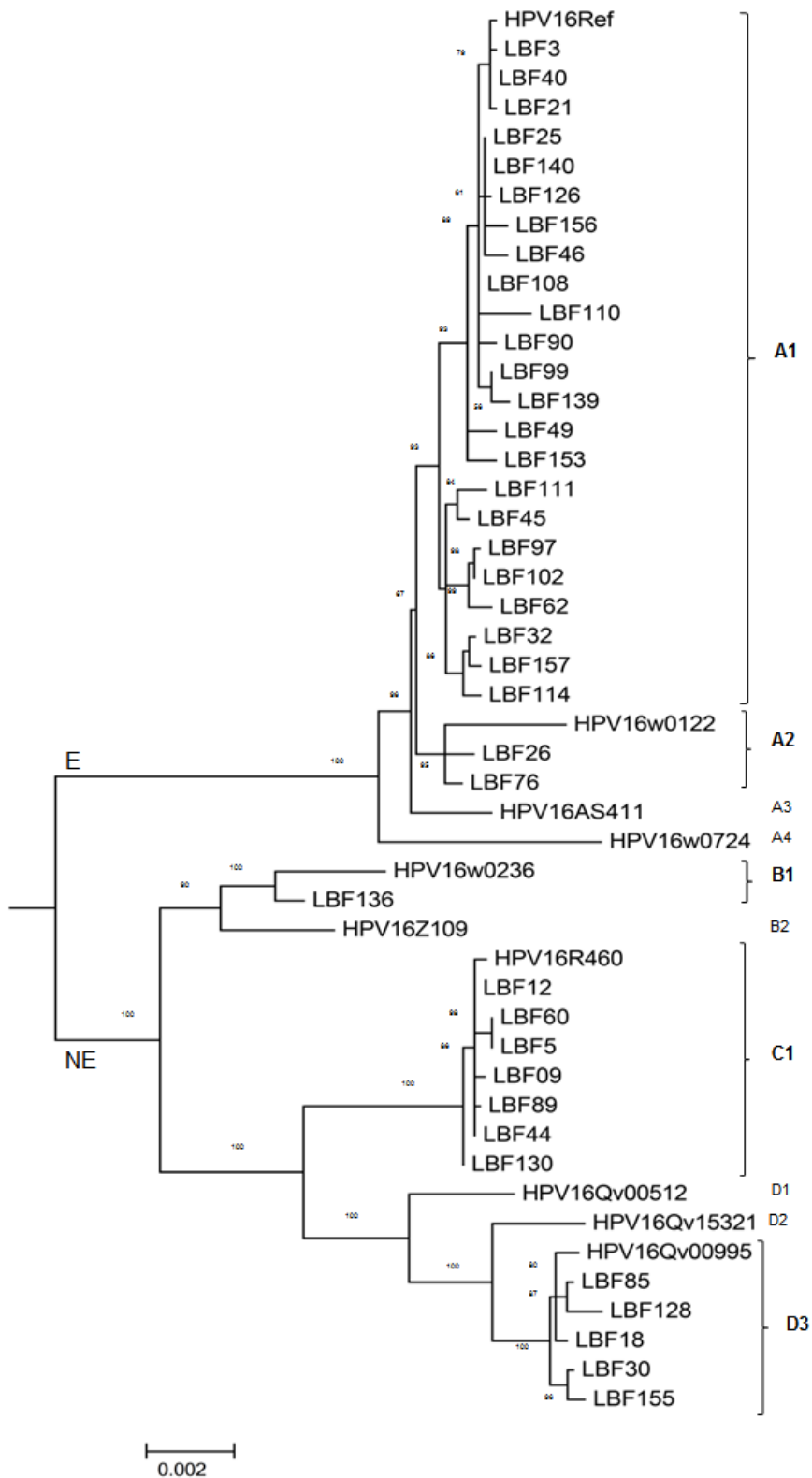


Figure 1. Tree topology. Phylogenetic tree was inferred from global alignment of complete and partial genome nucleotide sequences. Distinct variant lineages (i.e., termed A, B, and C) are classified according to the topology and nucleotide sequence differences from > 1% to < 10%; distinct sublineages (e.g., termed A1 and A2) were also inferred from the tree topology and nucleotide sequence differences in the > 0.5% to < 1% range [22].

Table S1. Reference sequences used to perform the alignment for phylogenetic analysis.

Type	Lineage	Sublineage	Variant Genome ID	GenBank Accession #	Other names*
HPV16	A	A1	Ref	K02718	European (E)
		A2	W0122	AF536179	E
		A3	AS411	HQ644236	E
		A4	W0724	AF534061	Asian, E(As)
	B	B1	W0236	AF536180	African-1, Afr1a
		B2	Z109	HQ644298	African-1, Afr1b
	C		R460	AF472509	African-2, Afr2a
	D	D1	QV00512	HQ644257	North American (NA)1
		D2	QV15321	AY686579	Asian-American (AA)2
		D3	QV00995	AF402678	Asian-American (AA)1

