

GILDO FRANCISCO DOS SANTOS JR

**DETECÇÃO DO PAPILOMAVIRUS HUMANO EM SANGUE
PERIFÉRICO DE GESTANTES PORTADORAS DO HIV-1.**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina para obtenção do título de
Doutor em Ciências**

**Orientador: Prof. Dra. Inara Espinelli
Lemes de Souza**

**Co-orientadora: Dra. Giana Rabelo
Mota**

São Paulo
2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

SANTOS JR, Gildo Francisco dos

Deteção do Papilomavirus Humano em Sangue Periférico de Gestantes Portadoras do HIV-1. / Gildo Francisco dos Santos JR – São Paulo, 2005.

69 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.

Programa de Pós-graduação em Ciências Básicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Título em Inglês: Detection of human papillomavirus (HPV) in peripheral blood cells of HIV-1 positive pregnant women.

1. HPV 2. Gravidez 3. HIV 4. DSTs 5. Sangue Periférico

À Deus

*“... que na sua infinita bondade, compreendeu
o meu anseio e deu-me a necessária coragem
para atingir o meu objetivo”*

*À minha esposa Camila
e às minhas filhas Luiza e Beatriz,
meus grandes amores, a quem meu
trabalho subtraiu incontáveis horas de convívio.*

*Aos meus pais,
“... pelos mais importantes ensinamentos da
minha vida: amar o próximo, nunca
esmorecer e sempre lutar com dignidade.
Sem eles eu nada seria”*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Inara Espinelli Lemes de Souza, pela sua dedicação, seus ensinamentos e principalmente pelo exemplo de humildade e sabedoria.

À minha co-orientadora Dra. Giana Rabello Mota, pela amizade e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz, que sempre esteve pronto a ajudar e colaborar cientificamente, enriquecendo o trabalho desenvolvido.

Aos colegas do Laboratório de Retrovirologia e Microbiologia Molecular: Charlys, Carlos, Dercy, Beth, Ana Carolina, Janaína, Eduardo, Wilson, Cristiano, Gedson, Fábio, Graziela, Patrícia, Cecília, Sandra e Mário, pelo companherismo compartilhado durante estes anos.

Aos professores e funcionários da Disciplina de Doenças Infecciosas da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP, pela dedicação, auxílio e presteza no excelente trabalho realizado em conjunto.

A equipe do Núcleo de Patologias Infecciosas na Gestação pelo excelente trabalho desempenhado e atenção dispensada às gestantes que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de São Paulo, especialmente ao Departamento de Medicina, Disciplina de Doenç as Infecciosas e Parasitárias, pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho.

  todas as gestantes que participaram deste estudo, dando seu consentimento para a realização deste trabalho.

  Fundação de Amparo ao docente e ao Aluno (FADA), pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

<i>LISTA DE FIGURAS</i>	<i>ix</i>
<i>LISTA DE TABELAS</i>	<i>x</i>
<i>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</i>	<i>xi</i>
<i>RESUMO</i>	<i>xii</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>xiii</i>
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histórico.....	1
1.2. Biologia do Papilomavírus Humano.....	2
1.3. Classificação viral quanto ao seu potencial oncogênico	4
1.4. Epidemiologia do câncer do colo do útero	5
1.5. Fatores de risco para infecção pelo HPV	6
1.6. Transmissão do HPV	6
1.7. HPV em portadoras do HIV-1	7
1.8. Detecção do Papilomavírus em sangue periférico	9
1.9. Diagnóstico para infecção pelo HPV	10
2. OBJETIVOS	12
3. CASUÍSTICA E METODOLOGIA	13
3.1. População estudada	13
3.2. Delineamento do estudo	14
3.3. Coleta do material.....	14
3.4. Metodologia laboratorial detecção de DNA-HPV no creme leucocitário.....	14
3.4.1. Extração do ácido desoxirribonucléico (DNA) do HPV.....	14
3.4.2. Amplificação da cadeia de β -globina por PCR.....	14
3.4.3. Amplificação do HPV pela técnica do “Nested” PCR.....	15
3.5. Metodologia laboratorial identificação de DNA-HPV no creme leucocitário.....	16
3.5.1. Purificação dos produtos do “Nested”PCR.....	16
3.5.2. Identificação do tipo específico de HPV por sequenciamento automatizado.....	16
3.5.3. Análise das seqüências de nucleotídeos.....	17
3.5.4. Amplificação do HPV pela técnica do “Nested” PCR com diluição limite final (“End Point”).....	17

3.6. Exames complementares.....	17
3.6.1. Análise citopatológica.....	17
3.6.2. Detecção de DST no raspado cervico-vaginal.....	18
3.6.3. Detecção de DNA-HPV por Captura Híbrida no raspado cervical.....	18
3.6.4. Detecção de DNA-HPV por PCR em raspado cervical.....	18
3.6.5. Identificação do tipo específico de HPV presente no raspado cervical por análise do polimorfismo de fragmento de restrição (RFLP).....	19
3.6.6. Identificação do tipo de HPV por sequenciamento automatizado.....	19
3.7. Análise Estatística.....	19
4. RESULTADOS.....	21
4.1. Prevalência de DNA-HPV pelo método de Nested-PCR no sangue periférico de gestantes HIV-1 positivo.....	21
4.2. Identificação dos tipos de HPV.....	21
4.2.1. Identificação dos produtos amplificados através do sequenciamento em amostras de sangue periférico.....	21
4.3. Comparação entre os tipos de HPV cervical e HPV sangüíneo.....	23
4.4. Avaliação do número de células CD4+, carga viral do HIV-1, carga viral do HPV cervical e a presença de DSTs na invasão da corrente sanguínea pelo HPV.....	25
4.4.1. Relação entre a presença do DNA-HPV no sangue periférico e níveis sanguíneos de linfócitos T CD4+ na gestação.....	25
4.4.2. Relação entre DNA-HPV no sangue periférico e carga viral do HIV-1.....	26
4.4.3. Relação entre DNA-HPV no sangue periférico e carga viral do HPV cervical.....	27
4.4.4. Relação entre DNA-HPV no sangue periférico e DSTs.....	27
4.5. Análise dos fatores de risco para presença de DNA-HPV no sangue periférico.....	28
4.5.1. Análise de regressão logística univariada.....	28
4.5.2. Análise de regressão logística multivariada.....	30
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSÃO.....	37
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência adquirida

CH-II: Captura Híbrida II

DST: Doenças Sexualmente Transmissíveis

DNA: Ácido Deoxiribonucleico

DP: Desvio padrão

HPV: Papilomavírus Humano

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

IC: Intervalo de confiança

LIEBG: Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau

LIEAG: Lesão intra-epitelial escamosa de alto grau

KCl: Cloreto de magnésio

mM: milimolar

µL: microlitros

NaCl: Cloreto de sódio

ng: nanogramas

NIC: Neoplasia intra-epitelial cervical

nm: nanômetro

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

Pb: Pares de base

OR: *odds ratio*

RFLP: *Restriction fragment length polymorfism*

RNA: Ácido ribonucleico

RLU: Unidade de luz relativa

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Prevalência de HPV no sangue periférico pelo método de Nested-PCR nos grupos de gestantes HIV-1 Positivo com infecção cervical por HPV (n = 60) e gestantes HIV-1 positivo sem infecção cervical por HPV (n = 50).....	21
Tabela 2 – Comparação dos resultados de CH-II cervical, tipos de HPV cervical com os tipos de HPV sangüíneo detectados no grupo de gestantes HIV-1 positivo com infecção cervical cervical por HPV (n=15).....	23
Tabela 3 – Tipos de HPV detectados no sangue periférico no grupo de gestantes HIV-1 positivo sem infecção cervical por HPV (n=2).....	25
Tabela 4 – Associação dos níveis sanguíneos de células CD4+ de acordo com a positividade de DNA-HPV no sangue periférico no grupo de gestantes HIV-1 positivo (n=110).....	26
Tabela 5 – Carga viral plasmática do HIV-1 de acordo com a positividade de DNA-HPV no sangue periférico no grupo de gestantes HIV-1 positivo (n=110).....	26
Tabela 6 – Comparação da carga viral do HPV cervical com a positividade de DNA-HPV no sangue periférico no grupo de gestantes HIV-1 positivo (n=110).....	27
Tabela 7 – Presença de DSTs de acordo com a presença de DNA-HPV no sangue periférico no grupo de gestantes HIV-1 positivo (n=110).....	28
Tabela 8 – Razões de chance dos fatores estudados em relação à presença de DNA-HPV no sangue periférico em gestantes HIV-1 positivo (n=110) pela regressão logística univariada.....	29
Tabela 9 – Razões de chance dos fatores estudados em relação à presença de DNA-HPV no sangue periférico em gestantes HIV-1 positivo (n=110) pela regressão logística multivariada.....	30

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Mapa físico do genoma do HPV-16. Região precoce (*Early*), região tardia (*Late*) e LCR (*Long Control Region*) que corresponde à região regulatória. No seguimento L1 está representada a região amplificada pelos *primers* My11/My09 e Gp05/Gp06. (Figura criada a partir da sequência proposta por Seedord *et al.* (1985), genbank - K02718).....3

FIGURA 2 – Distribuição dos tipos de HPV identificados no sangue periférico nos grupos de gestantes HIV-1 Positivo com infecção cervical por HPV (n = 15) e gestantes HIV-1 positivo sem infecção cervical por HPV (n = 2).....22

RESUMO

Os papilomavírus humanos (HPV) estão associados a diversas lesões do trato anogenital, tanto malignas quanto benignas. A imunodeficiência, como a encontrada em pessoas portadoras de HIV é um fator de risco para infecções genitais por HPV e sua progressão para neoplasias intra-epiteliais e cânceres genitais. O objetivo do presente estudo foi avaliar através de técnicas de biologia molecular, a prevalência da presença de DNA-HPV no sangue periférico entre as gestantes HIV-1 positivo. Um total de 60 gestantes HIV-1 positivo com infecção cervical positivo por HPV e 50 gestantes HIV-1 positivo sem infecção cervical por HPV apresentavam resultados de pesquisa de HPV cervical pelos métodos moleculares (Captura Híbrida-II e PCR/RFLP) e contagem de células CD4+ e carga viral do HIV-1 do plasma. As amostras disponíveis de sangue periférico das gestantes selecionadas foram submetidas à Nested-PCR seguido de sequenciamento para a pesquisa de DNA-HPV. A DNA-HPV foi detectado em 25,0% das gestantes HIV-1 positivo com infecção cervical por HPV e 4,0% das gestantes HIV-1 positivo sem infecção cervical por HPV ($p=0,002$). Nível de células CD4+ ≤ 200 células/mm³, presença de infecção cervical por HPV com alta carga viral (> 200 RLU) são preditivo de uma maior probabilidade de presença de DNA-HPV no sangue periférico. Estes dados evidenciam a presença do DNA-HPV no sangue periférico. A presença do genoma de HPV em sangue periférico ainda é controversa e deve ser melhor estudada para que possa ser relacionada com o desenvolvimento de lesões malignas.

ABSTRACT

Papilomavírus human (HPV) are associated with several lesions of the anogenital tract and are present in a variety of both malignant and benign lesions. The immunodeficiency, as the found one in carrying people of HIV is a factor of risk for genital infections for genital HPV and its progression for intra-epithelial neoplasias and cancers. The objective of the present study was to evaluate through techniques of molecular biology, the prevalence of the presence of DNA-HPV in the peripheral blood between the pregnant positive HIV-1. A total of 60 pregnant positive HIV-1 with positive cervical infection for HPV and 50 pregnant positive HIV-1 without cervical infection for HPV presented results of cervical research of HPV for the molecular methods (Hybrid Capture II and PCR/RFLP) and counting of cells CD4+ and viral load of the HIV-1 of the plasma. The available samples of peripheral blood of the selected pregnant had been submitted to the followed Nested-PCR of sequencing for the research of DNA-HPV. The DNA-HPV was detected in 25,0% of pregnant positive HIV-1 with cervical infection for HPV and 4.0% of the pregnant positive HIV-1 without cervical infection for HPV ($p=0,002$). Level of cells CD4+ ≤ 200 células/mm³, presence of cervical infection for HPV with high viral load (>200 RLU) are predict of a bigger probability of presence of DNA-HPV in the peripheral blood. The role of HPV viremia is controversial and warrants further investigation to determine its relationship with genital infection and whether there is a correlation with development of malignancies in HIV-infected individuals

1- INTRODUÇÃO

1.1- Histórico

Na Grécia Antiga, as lesões verrugosas ou papilomatosas eram descritas como doenças que atingiam a pele de várias áreas do corpo, como a genital, palmar e plantar. Além disso, eram associadas a doenças venéreas, pois os indivíduos afetados tinham comportamento homossexual, incestuoso e promíscuo (Bafverstedt, 1967).

Na década de 1920, estudos epidemiológicos consideraram a possibilidade de o contato sexual ser o meio de transmissão das verrugas genitais. Apesar de não se conhecer o agente causador dessa doença, as primeiras observações a respeito das alterações no epitélio vaginal foram feitas por Papanicolaou, em 1933. Neste mesmo ano, Shope & Hurst isolaram o possível agente causador de verrugas em coelhos – o vírus do papiloma. Desde então, esta classe viral tem sido discutida como agentes infecciosos naturais, responsáveis pelo desenvolvimento de verrugas em diferentes grupos de mamíferos, inclusive no homem (Pfister, 1984).

Em 1949, Strauss e colaboradores, através da microscopia eletrônica, conseguiram visualizar as partículas de papilomavírus em verrugas humanas, porém, a estrutura do genoma viral só foi desvendada em 1963 por Crawford & Crawford. Entretanto, nos anos subseqüentes, a indisponibilidade de um sistema de cultura de tecidos e a aparente natureza benigna das verrugas humanas desestimularam os pesquisadores.

O interesse gradual em papilomavírus ressurgiu nos anos 70, quando se desenvolveu a hipótese de que os papilomavírus poderiam ter um significado importante na etiologia do câncer do colo do útero (zur Hausen *et al*, 1974; zur Hausen *et al*, 1976).

Nos últimos trinta anos, uma série de estudos moleculares e epidemiológicos confirmou que a infecção da cérvix uterina por certos tipos de papilomavírus é um evento precursor na gênese da neoplasia desta região (zur Hausen, 1991; Schiffman *et al*, 1993; Bosch *et al*, 1995; Franco, 1995; Schiffman *et al*, 1995; revisado por zur Hausen, 2002).

Por constituir um grupo de vírus heterogêneo, os papilomavírus (HPV) estão também associados a lesões benignas e pré-malignas do colo uterino, consideradas lesões intra-epiteliais escamosas (SIL), à citologia ou neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC) e à histopatologia (zur Hausen, 1991; Lorincz *et al*, 1992).

1.2 – Biologia do Papilomavírus Humano

Os papilomavírus são compostos por um grupo de pequenos vírus de DNA de dupla fita, pertencentes à família *papillomaviridae*, gênero *papillomavirus*, capazes de infectar animais e homens. São vírus epiteliotrópicos altamente espécie-específica, e não se conhece qualquer exemplo de papilomavírus de uma espécie que cause infecção produtiva em outra espécie (Howley, 1996; van Regenmortel *et al*, 2000).

Trata-se de vírus não envelopado, de simetria icosaédrica e um genoma de aproximadamente 8000 pares de base (8kb) de DNA dupla fita, circular (Favre *et al*, 1977). O DNA está associado a proteínas semelhantes a histonas, circundado por 72 capsômeros formados por duas proteínas estruturais, L1 e L2 (Howley, 1996).

O genoma viral está dividido em três regiões denominadas ORFs (*Open Reading Frames* ou unidades de tradução), localizados em uma mesma fita de DNA e atualmente são conhecidas como genes. Com relação à organização do genoma viral, há três fragmentos subgenômicos que podem ser identificados: região precoce (*Early*), região tardia (*Late*) e a região denominada NCR (*non-coding region*) ou LCR (*Long Control Region*) (figura 1). Até oito genes estão na região precoce e dois na região tardia. Os genes da região precoce, denominados E1, E2, E3,..., E8, têm função na replicação (E1), na transcrição do DNA (E2, E1) e na transformação celular (E5, E6 e E7) (Chen *et al*, 1982; Howley, 1996; revisado por zur Hausen, 2000).

Os genes L1 e L2, da região tardia, codificam as proteínas principal e secundária do capsídeo, respectivamente, ambos são seqüências altamente conservadas entre todos os papilomavírus (Bernard *et al*, 1994). A proteína L1 é a mais abundante do capsídeo viral e constitui cerca de 80% do total das proteínas virais. A proteína L2, associada a L1, participa da incorporação do DNA viral dentro do virion (revisado por Zhou & Frazer, 1996).

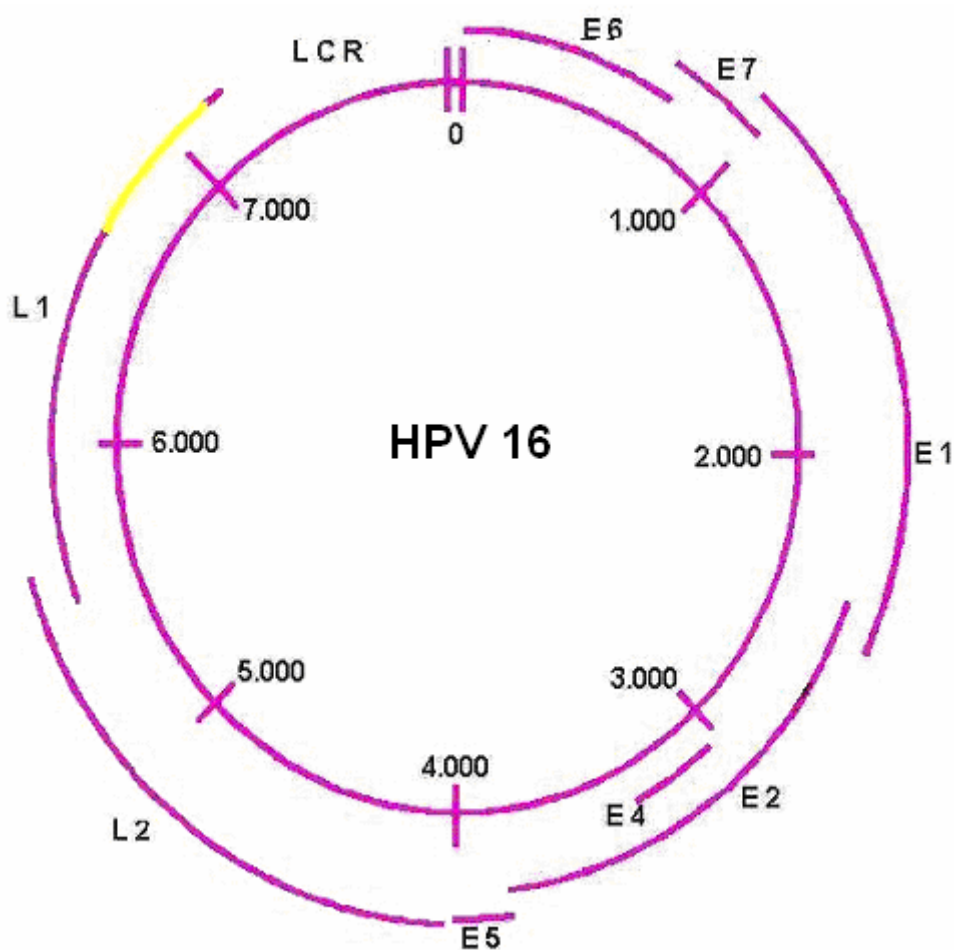


FIGURA 1 – Mapa físico do genoma do HPV-16. Região precoce (*Early*), região tardia (*Late*) e LCR (*Long Control Region*) que corresponde à região regulatória. No segmento L1 está representada a região amplificada pelos *primers* My11/My09 e Gp05/Gp06. (Figura criada a partir da sequência proposta por Seedord *et al* (1985), genebank — K02718.)

O gene E2 codifica pelo menos duas proteínas diferentes que atuam como fatores de transcrição (Bouvard *et al*, 1994). Elas afetam diferentemente a expressão gênica viral e representam os principais reguladores intra-genômicos através da formação de dímeros em sítios específicos de ligação presentes na LCR (Thierry & Yaniv, 1987). A deleção e/ou rompimento de gene E2 são eventos freqüentemente observados em biópsias de tecidos tumorais e linhagens celulares derivadas de cânceres cervicais (Schwarz *et al*, 1985), o que leva a supor que alterações em E2 facilitam a transformação de células humanas e a transcrição para o fenótipo maligno (revisado por zur Hausen, 1996). A proteína E2 também interage com E1 na estimulação de replicação porque facilita a ligação de E1 com a origem de replicação (Chiang *et al*, 1992).

Os genes E6 e E7 codificam as oncoproteínas envolvidas nas atividades de imortalização e transformação celular (Barbosa & Schlegel, 1989; Hawley-Nelson *et al*, 1989; Munger *et al*, 1989). Essas proteínas de HPVs de alto risco oncogênico estimulam a proliferação celular porque interagem e suprimem as funções de proteínas celulares envolvidas no controle desta. Por isso, acredita-se que o potencial oncogênico desses vírus seja, em parte, resultado dessas interações.

1.3 – Classificação viral quanto ao seu potencial oncogênico

Com base em evidências epidemiológicas e moleculares, sabe-se que a infecção pelo papilomavírus humano é o fator mais importante nos estágios iniciais da neoplasia cervical. Há cerca de 120 genótipos de HPV identificados, e desses aproximadamente 40 tipos infectam o trato anogenital, sendo que pelo menos 20 estão associados ao carcinoma do colo do útero (Munoz *et al*, 2003). Os tipos de HPV que infectam o trato genital podem ser divididos em dois grupos. O grupo de baixo risco oncogênico, que inclui os tipos que ocorrem freqüentemente em lesões intra-epiteliais de baixo grau, é constituído, entre outros, pelos tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81. O grupo de alto risco oncogênico, encontrado nas lesões intra-epiteliais de alto grau, e especialmente nos carcinomas, abrange os tipos de HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 (Munoz *et al*, 2003). A classificação dos HPVs em grupos de risco tende a ser muito variável, pois há diversos critérios de agrupamento, baseados tanto em

procedimentos biológicos *in vitro* como em filogenia, a partir de homologia de seqüências de DNA ou epidemiologia (IARC Working Group, 1995).

Noventa por cento das patologias associadas ao HPV no colo do útero localizam-se na transição escamo-colunar do epitélio ou zona de transformação, onde as células proliferativas estão mais expostas. Os papilomavírus infectam as células da camada basal do epitélio. Nessa fase, a expressão gênica viral é amplamente suprimida, embora a expressão de alguns genes virais precoces (E5, E6 e E7) seja limitada, resultando em uma intensa proliferação das células infectadas e na sua expansão lateral. Em um segundo momento, parte da progênie viral migra para as células em diferenciação da camada suprabasal, onde se inicia a expressão dos genes virais tardios. O genoma circular é então replicado e se formam as proteínas estruturais que irão compor o capsídeo viral. Nas camadas superiores do epitélio ocorre a montagem das partículas virais completas e, conseqüentemente, a liberação das mesmas para que o ciclo seja reiniciado (zur Hausen, 2002).

A infecção resulta no aparecimento de alterações morfológicas devido às diferenças no crescimento e diferenciação das células infectadas, resultando na perda de um padrão de estratificação em camadas de células diferenciadas. Um amplo espectro de lesões está associado à presença do HPV, desde anormalidades citológicas incipientes, displasias de diferentes graus, até carcinoma invasor (revisado por Villa, 1997).

1.4 – Epidemiologia do câncer do colo do útero

O câncer do colo do útero é o segundo mais comum entre as mulheres no mundo todo, com aproximadamente 450.000 novos casos diagnosticados a cada ano e aproximadamente 200.000 mortes registradas (Bosch *et al*, 1997; Sherlaw-Johnson *et al*, 1997). Este tipo de câncer representa 12% de todos os tumores malignos em mulheres (Pisani *et al*, 2002). É uma doença que pode ser prevenida e está diretamente vinculada ao grau de desenvolvimento do país. Estudos recentes mostram que as taxas mais altas de incidência de câncer do colo uterino ocorrem na América do Sul, África e no sul Asiático (Pisani *et al*, 2002) ao contrário da Europa, da América do Norte e de alguns países do Oriente Médio, onde esses tumores são incomuns e, às vezes, raros (IARC Working Group, 1995).

No Brasil, estima-se que o câncer do colo do útero seja o terceiro mais comum na população feminina, sendo superado pelo câncer de pele não-melanoma e pelo de mama. Pesquisas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) de 1999 mostram que as maiores incidências são observadas na região norte (43.86/100.000 mulheres), seguida pela região nordeste (33.14/100.000 mulheres). De acordo com dados absolutos sobre a incidência e mortalidade por câncer do INCA, o câncer de colo do útero foi responsável pela morte de 3.953 mulheres no Brasil, em 2000. Para 2003, as estimativas sobre incidência e mortalidade por câncer prevêm 16.480 novos casos e 4.110 óbitos.

1.5 – Fatores de risco para a infecção pelo HPV

Segundo estudos epidemiológicos, os principais fatores de risco para infecção por HPV são a idade do primeiro coito e a promiscuidade sexual (Franco 1995; Brinton *et al*, 1989). Outro fator determinante é a idade – o risco diminui com o envelhecimento, independentemente da atividade sexual e do número de parceiros (Bauer *et al*, 1993). O hábito de fumar, o uso de pílulas anticoncepcionais por longos períodos e o número de gestações também estão associados (Bauer *et al*, 1993; Franco, 1995; Ylitalo *et al*, 1999; Rousseau *et al*. 2000; Moreno *et al*, 2002; Muñoz *et al*, 2002).

Na patogênese das lesões por HPV, o estado imunológico das pacientes representa um fator de grande importância. A incidência de HPV, condiloma, enfermidade pré-invasiva e câncer aumenta significativamente em pacientes com o sistema imunológico comprometido, mais especificamente naqueles que se submeteram a transplantes renais e nos infectados pelo HIV com redução de células T circulantes (Delgado,1993).

1.6 – Transmissão do HPV

Sabe-se que em 95% dos casos a transmissão do HPV ocorre através do contato sexual e que as infecções não tratadas favorecem a perpetuação da doença nos parceiros sexuais. Contudo, a transmissão do HPV também pode acontecer por outros meios. É provável que o HPV seja transmitido por fômites (toalhas, roupas íntimas, etc.) e também pelo instrumento ginecológico. Embora não se saiba por quanto tempo o vírus sobrevive fora do organismo, considera-se a transmissão por fômites viável por um curto período de tempo (Bergeron *et al*, 1990; Seddlacek *et al*, 1989; Oriel, 1971).

A transmissão materno-fetal do HPV é bastante considerada, levando-se em conta a ocorrência de papiloma juvenil de laringe em crianças com menos de 2 anos, e com base em alguns casos de recém-nascidos com condiloma genital (Quick *et al*, 1980; Rogo & Nyansera, 1989; Tseng *et al*, 1998; Chen *et al*, 1993). Armbruster-Moraes *et al* (1994) detectaram a presença de DNA do HPV-16 e HPV-18 no líquido amniótico de 24 de 37 gestantes portadoras de doença cervical relacionada ao HPV, resultando numa prevalência de 64,9%. Tseng *et al* (1998) pesquisaram a presença de HPV16 e HPV-18 nos neonatos, filhos de mães HPV positivas, analisando as mucosas oral e genital através de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Uma taxa significativamente mais alta de infecção pelo HPV-16 e HPV-18 foi observada em crianças nascidas de parto vaginal em relação aos nascidos de cesariana.

Outros autores, estudando a possibilidade de transmissão vertical, relataram uma alta prevalência de detecção de DNA do HPV na região genital e/ou oral de recém-nascidos. Alguns sugerem que a detecção de partículas de HPV nos recém-nascidos pode ser decorrente da contaminação por secreções maternas e não do epitélio dos recém-nascidos, utilizando a medida após as primeiras 24 horas (Pakarian *et al*, 1994; Kaye *et al*, 1994; Cason *et al*, 1995; Kaye *et al*, 1996).

1.7– HPV em portadoras do HIV-1

Os fatores de risco associados à transmissão da infecção por HIV são a relação sexual sem proteção com um parceiro infectado, ou com múltiplos parceiros, e a presença de DSTs associadas (Castilho & Chequer, 1996).

A infecção pelo HPV, latente e controlada pelo sistema imunológico do hospedeiro, tende a se manifestar clinicamente em um organismo com deficiência nesse sistema. Assim, observa-se uma franca associação entre infecções causadas pelo HPV e HIV. Em pacientes HIV soropositivos prevalecem as lesões HPV-induzidas, especialmente naquelas com número de linfócitos CD4 positivos abaixo de 500 células/mm³. A infecção provocada pelo HIV parece induzir a replicação do HPV, intensificando o processo infeccioso por ele produzido e promovendo a reativação e sua persistência. Da mesma forma, as lesões invasoras do colo uterino são mais agressivas e têm pior prognóstico, além de estar incluídas nas condições de definição de doença SIDA (Klein *et al*, 1994;

Calore *et al*, 1995; Garzetti *et al*, 1995; Unger *et al*, 1997; Arany & Tying, 1998; Calore *et al*, 1998; Kuhn *et al*, 1999; Ebrahim *et al*, 2000; Ellerbrock *et al*, 2000, Ahdieh *et al*, 2001).

Do ponto de vista biomolecular, o gene *tat-1*, proteína regulatória do HIV-1, estaria associado à exacerbação da expressão do HPV. O gene *tat-1*, em combinação com a proteína E2 do HPV-16, realçaria a transativação da região da seqüência regulatória do HPV, estimulando assim a expressão dos genes do HPV, mesmo em pacientes com sistema imunológico eficiente (Chopra *et al*, 1997). Por outro lado, a alta incidência de lesões mais agressivas talvez seja explicada pelas infecções causadas por HPV persistente, o que ocorre mais comumente em mulheres HIV soropositivos (Ahdieh *et al*, 2000).

A influência da imunossupressão, especialmente a mediada por células no desenvolvimento de lesões invasoras, a partir de processos neoplásicos intra-epiteliais relacionados aos papilomavírus, mostra-se cada vez mais evidente. A resposta humoral, por sua vez, é forte no início do processo infeccioso, mas torna-se instável com o tempo. Múltiplos tipos de HPV são detectados nas pacientes imunossuprimidas, que costumam evoluir com doença intra-epitelial HPV induzida mais grave. Extensas, as lesões atingem o colo, a vagina, vulva, o períneo e a região perianal, simultaneamente. É menor o tempo de recorrência e mais rápida a evolução para doença invasora seguida de óbito (Carson *et al*, 1986; Caussy *et al*, 1990; Brown *et al*, 1993; Van Doornum *et al*, 1993, Brown *et al*, 1994; Miotti *et al*, 1996, Chopra *et al*, 1997).

A infecção persistente pelo HPV na mucosa genital é um importante fator de neoplasia intra-epitelial em pacientes HIV soropositivos. Nesses, é alta a incidência de infecção provocada pelo HPV, caracterizada por freqüentes recidivas e progressão de doença, além de um maior fracasso terapêutico.

Constata-se, ainda, que os HPV 16 e 18 prevalecem nas pacientes HIV soropositivas, acompanhadas de multiplicidade de outros subtipos virais, em relação às mulheres HIV soronegativas. Pacientes HIV soropositivos costumam, ainda, apresentar uma alta carga viral de HPV-DNA. A alta carga viral de HPV oncogênico, especialmente o HPV-16, predispõe ao aparecimento de lesão cervical de grau elevado e de moléstia invasora. Todavia, a prevalência de neoplasia intra-epitelial na ausência de infecção pelo HPV não aumenta (Sun *et al*, 1995; Josesson *et al*, 2000).

A infecção causada pelo HPV na mulher HIV soropositiva é mais freqüente, persistente e resistente a tratamento, e evolui mais rapidamente para graus mais avançados. Assim, essas pacientes necessitam de uma avaliação rotineira para diagnosticar infecção causada pelo HPV e/ou neoplasia intra-epitelial associada (Maiman *et al*, 1991; Korn *et al*, 1994; Henry *et al*, 1989; Maiman *et al*, 1998).

1.8 – Detecção do papilomavírus em sangue periférico

Há algum tempo, discute-se que linfócitos de sangue periférico de diferentes animais sejam possíveis sítios de latência para os vírus do papiloma (Stocco dos Santos *et al*, 1998; Nasir *et al*, 1997; Campo *et al*, 1994).

Estudos do papel do Papilomavírus Bovino (BPV) em associação com agentes ambientais e imunossupressores no desenvolvimento dos tumores no trato alimentar de bovinos revelaram a presença de BPV-2 na circulação periférica dos animais do grupo experimental e controle (Campo *et al*, 1994). A partir destes achados concluiu-se que o BPV-2 poderia ser encontrado em estado de latência nos linfócitos destes animais. Outros estudos em bovinos, envolvendo possíveis mecanismos de transmissão dos BPVs, demonstraram a presença do DNA do BPV-2 em amostras de sangue periférico de bezerros recém-nascidos e a presença do DNA de BPV-2 e/ou BPV-4 em amostras de sangue, leite e urina de bovinos que tinham algum tipo de tumor relacionado à presença desta classe viral (Stocco dos Santos *et al*, 1998). Tais dados sugerem que estes vírus podem ser transmitidos vertical ou horizontalmente, além de reforçar a hipótese de que os linfócitos podem servir como sítio de latência para esta classe viral.

Em seres humanos, Pao *et al* (1991) estudaram a prevalência de HPV em células mononucleares no sangue periférico do trato urogenital de 25 mulheres portadoras de HPV, comparando-a com 19 controles sem doença urogenital, pareadas por idade, utilizando PCR. O HPV foi detectado em 13 (52%) das portadoras de HPV no trato genital contra nenhum caso dentre os controles. Tseng *et al* (1992) pesquisaram a prevalência de HPV detectado por PCR em amostras cérvico-vaginais e em células mononucleares do sangue periférico de 52 gestantes no terceiro trimestre da gestação, e em células

mononucleares do sangue periférico em 9 (17,3%). Detectou-se o HPV em células mononucleares do sangue do cordão umbilical de 7 (13,5%) recém-nascidos – o HPV havia sido detectado nas mães desses bebês em uma, ou ambas, amostras de sangue. Duas gestantes tinham HPV-18 no sangue periférico e uma no lavado vaginal, mas nenhuma teve filho com HPV detectável no cordão umbilical. A prevalência do HPV no sangue, considerando os dois tipos virais testados, foi então de 21,1% (11 casos) para as gestantes e de 13,5% (7 casos) no caso dos recém-nascidos. A presença do DNA de HPV no sangue periférico também foi evidenciada em mulheres e homens com infecções persistentes por HPV, apresentando condiloma acuminata (Karas & Poreba, 1998).

Outras evidências importantes que corroboram a presença do DNA de HPV foram obtidas, estudando-se pacientes com câncer cervical (Pornthanakasem *et al*, 2001; Dong *et al*, 2002; Widschwendter *et al*, 2004; Kay *et al*, 2005). Widschwendter *et al* (2004) investigaram 11 pacientes com histórico de câncer cervical associado ao câncer secundário de mama, cujos tecidos cervical, mamário e soro foram analisados por PCR para determinar a presença do DNA de HPV. Os resultados demonstraram a presença do HPV-16 em 6 pacientes, tanto no tecido cervical como no tecido mamário. Um dado importante é a presença do HPV-16 no tecido cervical, no tecido mamário e no soro, pois isto indica que o DNA do HPV pode ser transportado do sítio primário da infecção para o tecido mamário, através da corrente sangüínea.

Assim, os achados obtidos sugerem o desenvolvimento de outras pesquisas que evidenciem a presença dos HPV em células não epiteliais para tornar estes dados mais consistentes. A presença do genoma de HPV no sangue periférico de pacientes com lesões ainda é controversa e necessita de mais estudos para ser relacionada ao desenvolvimento de lesões malignas.

1.9 – Diagnóstico para infecção pelo HPV

Tradicionalmente, a interpretação dos exames utilizados para diagnosticar lesões induzidas por HPV (citologia, colposcopia e histologia) é subjetiva, por isso sua acurácia está diretamente relacionada à experiência do examinador (Martins & Pereyra, 2000). A incorporação de técnicas de biologia molecular tem facilitado a detecção e monitoração do agente infeccioso, através de ensaios de hibridização de ácidos nucléicos virais,

precedidos ou não de amplificação gênica por PCR, método extremamente sensível na detecção do DNA viral (Manos *et al*, 1989). A presença de mais de 120 tipos dificulta o desenho de ensaios baseados em PCR para a detecção do DNA viral (de Villiers, 2001; Iftner & Villa, 2003). Assim, foram desenvolvidos ensaios de PCR baseados na utilização de iniciadores consenso, deduzidos a partir de regiões altamente conservadas do genoma dos HPVs (Manos *et al*, 1989; van den Brule *et al*, 1990), capazes de detectar um amplo espectro de tipos relevantes em apenas uma única reação. Os produtos resultantes dessa amplificação podem, então, ser tipados com sondas de oligonucleotídeos marcados isotopicamente ou não (Bauer *et al*, 1991; Jacobs *et al*, 1995), ou através de análise de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) (Bernard *et al*, 1994) ou, ainda, por sequenciamento. O ensaio de hibridização de ácidos nucléicos (captura híbrida), utiliza anticorpos na captura de híbridos com amplificação de sinal, sendo detectado pela quimioluminescência. A captura híbrida é um método semi-quantitativo capaz de detectar 18 tipos de HPV que mais comumente infectam o trato genital. Os tipos de sondas utilizadas diferenciam-se em dois grupos: o grupo A, composto de sondas para detectar tipos de baixo risco (6, 11, 42, 43, 44), e o grupo B, composto de sondas para detectar HPVs de risco intermediário e alto (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68).

1.10 – Justificativa

Na literatura mundial há poucos estudos sobre a presença do DNA-HPV no sangue periférico, plasma e soro em pacientes com lesões do trato anogenital, tanto malignas quanto benignas. Na literatura médica não existem estudos a respeito da prevalência da presença de DNA-HPV no sangue periférico de gestantes portadoras do HIV-1. A infecção causada pelo HPV na mulher HIV-1 soropositiva é mais freqüente, persistente e resistente a tratamento, e evolui mais rapidamente para graus mais avançados. Diante das evidências apresentadas, a população de estudo, constituída de mulheres grávidas e infectadas pelo HPV, merece maior investigação quanto à presença do DNA-HPV no

sangue periférico. A metodologia molecular ajuda a diagnosticar a presença do papilomavírus humano no sangue periférico, permitindo acompanhar suas manifestações e uma futura correlação com o desenvolvimento de lesões malignas que a paciente possa vir a desenvolver.

2 – OBJETIVOS

1- Determinar a prevalência do HPV na corrente sangüínea de gestantes portadoras do HIV-1.

2- Identificar os tipos de HPV detectados no sangue periférico da população estudada.

3- Investigar possíveis fatores de risco que resultem na invasão da corrente sangüínea pelo HPV.

3 – CASUÍSTICA E METODOLOGIA

3.1– População estudada

A população avaliada origina-se do estudo Avaliação da Infecção e Caracterização de Tipos de Papilomavírus Humano (HPV) em Gestantes Infectadas pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1), desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Molecular, na disciplina Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de São Paulo. O objetivo foi avaliar a prevalência da infecção causada pelo HPV cervical durante a gravidez e a persistência da infecção após o parto em gestantes HIV-1 positivo, caracterizando os tipos de HPV encontrados. As gestantes participantes do estudo original (N=188) estavam matriculadas no atendimento pré-natal, feito pelo Núcleo de Patologias Infecciosas na Gestação (NUPAIG), na disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIPA) da Universidade Federal de São Paulo, da Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM), entre outubro de 1998 e janeiro de 2001. Das gestantes (N=110) selecionadas foram retiradas amostras de sangue periférico no mesmo dia da coleta do material para estudo de HPV genital.

As 110 amostras foram classificadas em dois grupos: 1) mulheres gestantes HIV-1 positivo com resultado positivo para HPV cervical pelo método de captura híbrida (n=60), e 2) mulheres gestantes HIV-1 positivo com resultado negativo para HPV cervical pelo método de captura híbrida (n=50). Todas as mulheres preencheram os seguintes critérios: 1) ter infecção por HIV confirmada através de teste imunoenzimático e determinação da carga viral do HIV; 2) morar na cidade de São Paulo e estar matriculada no Núcleo de Patologias Infecciosas na Gestação (NUPAIG), na disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIPA) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) durante o período do estudo; 3) estar grávida; 4) concordar em participar do estudo e assinar o termo de consentimento.

3.2– Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo retrospectivo de múltiplas variáveis.

3.3 – Coleta do material

Durante a consulta pré-natal, além da colher material genital referente à pesquisa de DNA-HPV, foram também coletados tubos de sangue periférico para determinar o número de células T CD4 positivas por citometria de fluxo e a carga viral do HIV-1 pela metodologia NASBA. As amostras de sangue periférico foram levadas ao Laboratório de Retrovirologia e Microbiologia Molecular da DIPA e submetidas à centrifugação para se obter o plasma e o creme leucocitário (*buffy coat*). Parte do plasma foi imediatamente utilizada para quantificar a carga viral do HIV-1. O volume restante de cada amostra foi mantido a -70°C para pesquisa de DNA-HPV até o momento desse estudo.

3.4 – Metodologia laboratorial para detecção de DNA-HPV no creme leucocitário

3.4.1 – Extração do ácido desoxirribonucléico (DNA) do HPV

Extraíu-se o DNA do HPV do creme leucocitário (*buffy coat*) por meio do QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN Inc. – Santa Clarita, Califórnia, EUA). O procedimento técnico seguiu as instruções do fabricante.

3.4.2 – Amplificação da cadeia de β -globina por PCR

Com a finalidade de verificar a presença e qualidade do DNA extraído, as amostras foram submetidas à amplificação com *primers* específicos para um segmento da cadeia de beta da globina (Souza *et al*, 1994). Esta amplificação serviu de controle interno de qualidade das amostras. Na ausência de produto amplificado por esses *primers* (375pb), as amostras foram submetidas à nova extração de DNA.

A cada reação de PCR, controles positivo e negativo foram processados simultaneamente às amostras.

3.4.3 – Amplificação do HPV pela técnica do Nested PCR

É uma técnica de biologia molecular que visa realizar dois PCR sucessivos, utilizando o produto do primeiro como substrato para o segundo PCR. No primeiro PCR, um par de iniciadores externos (MY9/MY11) amplificou um segmento de 450pb (Manos, *et al*, 1989); no segundo PCR, um par de iniciadores internos amplificou um segmento de

150 pb (Gp5/Gp6) (Snijders, *et al*, 1990). O Nested PCR é necessário para assegurar a obtenção do fragmento interno a partir do externo, e não de outra seqüência genômica do hospedeiro. Além disso, permite amplificar milhares de produtos responsáveis pelo sequenciamento do HPV.

Para preparar a primeira reação de PCR (volume final de 50 μ l), foram utilizados os seguintes componentes e respectivas concentrações: tampão de enzima (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3) 1X, KCl 50 mM, MgCl₂ 2,5 mM, 200 μ M de cada dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 20pmol de iniciadores MY9/MY11 e 0,75 unidade de *Taq* DNA polimerase (Promega), em torno de 100 ng de DNA molde. As condições da reação no termociclador foram: um ciclo de 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 74°C por 45 segundos e, por último, um ciclo de 74°C por 7 minutos. No segundo PCR, a reação de amplificação continha 5 μ l do produto da primeira PCR e foram adicionados 45 μ l de uma solução com os seguintes componentes e respectivas concentrações: tampão de enzima (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3) 1X, KCl 50 mM, MgCl₂ 2,5 mM, 200 μ M de cada dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 20pmol de iniciadores Gp05/Gp06 e 0,75 unidade de *Taq* DNA polimerase (Promega). As condições da reação no termociclador foram: um ciclo de 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 45°C por 30 segundos e 74°C por 45 segundos e, por último, um ciclo de 74°C por 7 minutos. Em cada ensaio foram amplificados, além das amostras, um controle negativo (água desprovida de DNA) e um controle positivo (*pool* de amostras positivas).

Após a PCR, as amostras de DNA amplificado foram separadas em gel de agarose a 2,0% peso/volume em Tris-borato/EDTA, contendo brometo de etídeo (0.5 μ g/mL). O padrão marcador utilizado para a comparação do peso molecular dos fragmentos amplificados foi de 100 pb (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA). O gel foi visualizado sob iluminação ultravioleta e fotografado com câmara digital DC 40 (Kodak, Rochester, New York, EUA). As amostras que apresentaram produto amplificado na altura de 150 pb, quando comparadas com o padrão de peso molecular, foram consideradas positivas.

3.5 – Metodologia laboratorial para identificar o DNA-HPV no creme leucocitário

3.5.1 – Purificação dos produtos do Nested PCR

Precedendo a reação do sequenciamento, os produtos do Nested PCR foram purificados pelo QIAquick PCR Purification Kit, de acordo com as instruções do fabricante, com a finalidade de retirar nucleotídeos, enzimas e outras impurezas provenientes da própria reação de PCR.

3.5.2 – Identificação do tipo específico de HPV por sequenciamento automatizado

As reações de sequenciamento foram realizadas segundo a técnica de Sanger *et al*, 1977, utilizando-se o protocolo ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing – Perkin Elmer. Após a quantificação do produto de PCR, através da comparação das bandas dos produtos no gel de agarose (2,0%) com o padrão de massa molecular (Low DNA Mass ladder – Life Technologies) a fim de manter a concentração de template adequada ao sequenciamento, o produto foi adicionado na concentração de 100 a 200 ng/ μ L na reação de sequenciamento que continha 2 μ l de *big dye* de sequenciamento, 1 μ l de tampão de sequenciamento (1X), 1 μ l de *primer* Gp05/Gp06 (3,2 pmol) e água destilada em quantidade suficiente para 10 μ l. Esta reação foi submetida ao termociclador, seguindo a ciclagem de temperaturas: 94°C por 2 minutos, seguidos de 25 ciclos de 94°C por 10 segundos, 45°C por 20 segundos e 60°C por 4 minutos. Após a reação de sequenciamento no termociclador, todas as reações foram submetidas a precipitação de DNA. As fitas de DNA foram desnaturadas a 94°C durante 5 minutos e posteriormente colocadas no gelo. Depois disso a amostra foi aplicada no sequenciador automatizado

3.5.3 – Análise das seqüências de nucleotídeos

As duas fitas dos produtos dos genes foram manualmente editadas pelo programa Sequence Navigator. As seqüências do gene apresentaram um tamanho de aproximadamente 120 nucleotídeos.

Depois da edição, as seqüências de nucleotídeos foram comparadas com as do Genbank, por meio do programa Blast de procura de homólogos.

3.5.4 – Amplificação do HPV pela técnica do Nested PCR com diluição limite final (End Point)

As amostras de sangue periférico, nas quais identificou-se mais de um tipo viral, também foram submetidas à técnica de PCR com diluição limite final. A PCR foi feita nas mesmas condições descritas anteriormente, porém utilizou-se a técnica da diluição do limite final, como descrita por Simmonds *et al*, 1990. A última diluição seriada do DNA positiva foi adicionada a um tubo com 1ml da mistura da reação de PCR. Este volume foi distribuído em 20 tubos de 0,2ml (50ml cada tubo) e incubados no termociclador. Esse procedimento garante que as amplificações sejam provenientes de apenas uma molécula de DNA de HPV, útil para identificar mais detalhadamente a população viral.

3.6 – Exames complementares

3.6.1 – Análise citopatológica

Para a citologia, coletou-se esfregaço cérvico-vaginal, posteriormente fixado em álcool absoluto. Em seguida, fez-se a coloração através da técnica modificada de Papanicolaou no Laboratório de Citologia do Departamento de Ginecologia da UNIFESP. Os resultados foram classificados como normal, inflamatório, lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LIEBG) e lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (LIEAG), de acordo com a classificação estabelecida pelo sistema Bethesda (Kurman & Solomon, 1997).

As lesões intra-epiteliais de baixo grau abrangem as alterações celulares compatíveis com os efeitos citopatológicos do HPV e com displasia leve (NIC I). Por outro lado, as lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau compreenderam os achados citológicos correspondentes à displasia moderada (NIC II), grave (NIC III) e carcinoma *in situ*.

Células escamosas atípicas de significado indeterminado não foram aqui consideradas, pois as mulheres que apresentaram resultados insatisfatórios foram submetidas a uma nova coleta.

Para análise dos resultados, os mesmos foram classificados em negativo (normal e inflamatório) e positivo (LIEBG e LIEAG).

3.6.2 – Detecção de DST no raspado cérvico-vaginal

Para pesquisar as infecções cervicais, coletou-se material de fundo de saco vaginal e do intróito da endocérvice, seguindo a rotina clínica e laboratorial do NUPAIG. As amostras foram submetidas a exame a fresco, de acordo com os critérios de Ansel *et al* (1983) para pesquisa de tricomoníase, candidíase e micoplasma. Para detectar gonococo, clamídia e HPV, as amostras foram submetidas a teste de captura híbrida, utilizando-se o Kit Digene Cervical Sampler.

3.6.3 – Detecção de DNA-HPV por captura híbrida (CH-II) no raspado cervical

Utilizou-se o sistema do kit de captura híbrida para o teste de DNA-HPV em microplaca da Digene (Digene Corp.©, 1997), seguindo o procedimento técnico do fabricante. O teste detecta semi-quantitativamente a presença de 18 tipos de HPV, classificando-os em dois grupos: grupos A (HPV de baixo risco dos tipos 6, 11, 42, 43, 44), e grupo B (HPV de risco intermediário e alto dos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 59, 68). A leitura por quimioluminescência é medida em unidade de luz relativa (RLU) e permitiu a classificação dos resultados em baixa carga viral cervical do HPV (≤ 200 RLU) e alta carga viral (> 200 RLU).

3.6.4 – Detecção de DNA-HPV por PCR em raspado cervical

As 110 gestantes participantes deste estudo foram previamente submetidas à pesquisa de DNA-HPV em raspado cervical (Mota, 2002), utilizando-se os iniciadores MY09/MY11 (Manos *et al*, 1989) que amplificam a região altamente conservada do gene L1.

3.6.5 – Identificação do tipo específico de HPV presente no raspado cervical por análise do polimorfismo de fragmento de restrição (RFLP)

As amostras positivas para a PCR foram levadas e submetidas ao processo de digestão com enzimas específicas para a tipagem pela técnica de RFLP (*restriction*

fragment length polymorphism). A combinação dos padrões de RFLP obtidos em um conjunto de digestões enzimáticas permite identificar 44 tipos de HPV (Bernard *et al*, 1994). As amostras que apresentaram padrão indeterminado pela RFLP foram submetidas ao sequenciamento genético para identificar o tipo de HPV.

3.6.6 – Identificação do tipo específico de HPV por sequenciamento automatizado

Os produtos de PCR positivos para HPV com resultado indeterminado pela RFLP foram então submetidos a sequenciamento automático. As reações de sequenciamento seguiram a técnica de Sanger *et al*, 1977, por meio do protocolo ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing – Perkin Elmer. Os iniciadores utilizados para esta reação foram os mesmos utilizados na reação de PCR para a região estudada. Realizou-se a quantificação através da comparação das bandas dos produtos no gel de agarose (1,5%) com o padrão de massa molecular (Low DNA Mass ladder – Life Technologies) a fim de manter a concentração de *template* adequada para o sequenciamento. O programa Sequence Navigator editou manualmente as duas fitas dos produtos dos genes. Depois da edição, comparou-se as seqüências de nucleotídeos com as do Genbank, através do programa Blast de procura de homólogos.

3.7 – Análise estatística

Para descrever o perfil da amostra segundo as variáveis em estudo, foram feitas tabelas de freqüência das variáveis categóricas (idade, DST, HPV no sangue periférico e citologia) e estatísticas descritivas (com medidas de posição e dispersão) das variáveis contínuas (CD4+, carga viral do HIV-1 e carga viral do HPV cervical). As variáveis sem distribuição normal foram transformadas em logaritmo ($\log_{10}$).

Na comparação das variáveis categóricas entre os grupos, utilizou-se o teste Qui-Quadrado ou teste exato de Fisher, e na comparação das variáveis contínuas utilizou-se o teste t de Student (com variáveis transformadas em escala logarítmica).

Para analisar a influência dos fatores de interesse na presença de HPV no sangue periférico utilizou-se a Análise de Regressão Logística, modelo logito.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $p < 0.05$.

4 – RESULTADOS

4.1 – Prevalência de DNA-HPV no sangue periférico de gestantes HIV-1 positivo

A prevalência geral de DNA-HPV no sangue periférico em gestantes portadoras do HIV-1 foi 15,4% (17/110).

4.2 – Correlação entre a presença de HPV no colo cervical e no sangue periférico

Detectou-se a presença do DNA-HPV no sangue periférico em 15 das 60 gestantes (25%) com infecção cervical causada pelo HPV. No grupo de gestantes sem infecção cervical provocada pelo HPV, detectou-se o DNA-HPV em 2 das 50 gestantes (4%) ($p=0.002$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Prevalência de HPV no sangue periférico pelo método de Nested PCR nos grupos de gestantes HIV-1 positivo com infecção cervical provocada pelo HPV ($n = 60$) e gestantes HIV-1 positivo sem infecção cervical causada pelo HPV ($n = 50$)

DNA-HPV Sangue periférico	DNA-HPV Cervical	DNA-HPV Cervical	Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	15 (25%)	02 (4%)	17
Negativo	45 (75%)	48 (96%)	93
Total	60	50	110

TESTE QUI-QUADRADO: $\chi^2=9.21$; GL=1; $p=0.002$

A prevalência de DNA-HPV no sangue periférico entre gestantes HIV-1 sem infecção cervical causada pelo HPV foi significativamente inferior àquela encontrada entre gestantes HIV-1 positivo com infecção cervical positivo provocada pelo HPV ($p=0.002$).

4.3 – Identificação dos tipos de HPV

4.3.1– Identificação dos produtos amplificados através do sequenciamento em amostras de sangue periférico

As 17 amostras de gestantes HIV-1 positivo com pesquisa de DNA-HPV positivo por Nested PCR foram submetidas a tipagem por sequenciamento. Foi possível identificar um tipo de HPV em 14 dessas amostras, sendo que nas 3 amostras restantes observou-se mais de um tipo de HPV. Estas amostras foram então submetidas à amplificação pela técnica do Nested PCR com diluição limite final para a identificação detalhada da população viral. Esta amplificação demonstrou que as 3 amostras tinham 2 tipos de HPV diferentes que foram sequenciados isoladamente (Tabelas 2 e 3).

No grupo de gestantes HIV-1 positivo com infecção cervical positivo causada pelo HPV, foram encontrados 6 tipos diferentes de HPV no sangue periférico, sendo os mais prevalentes: HPV-58 (27,77%) e HPV-66 (27,77%), HPV-18 (22,22%), HPV-6B (11,11%), HPV-16 (5,55%), e HPV-11 (5,55%) (Figura 2).

No grupo de gestantes HIV-1 positivo sem infecção cervical causada pelo HPV, foram encontrados 2 tipos diferentes de HPV no sangue periférico: o HPV-11 e o HPV-MM8.

Os tipos de HPV identificados no sangue periférico e em material cervical estão ilustrados nas Tabelas 2 e 3.

FIGURA 2 – Distribuição dos tipos de HPV identificados no sangue periférico no grupo de gestantes HIV-1 positivo com infecção cervical provocada pelo HPV (n = 18)

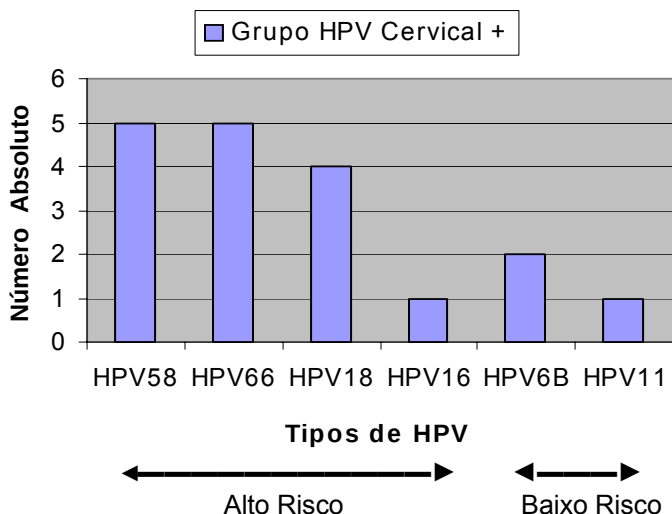


Tabela 2 – Tipos de HPV cervical e sangüíneo detectados no grupo de gestantes HIV-1 positivo com infecção cervical provocada pelo HPV (n=15)

Amostra	CH-II (RLU) Cervical	PCR/RFLP Cervical	Nested-PCR/Seq Sangue
1N	**B (1.414,0)	HPV-58	HPV-58
11N	*A (744,6) B (1,828,0) A (12,6)	HPV-11-18-61	HPV-18
14N	B (1.636,3)	HPV-16-18-26-58-81	HPV-11
18N	A (35,7) B (1.048,8)	HPV-66	HPV-66
74N	B (2.565,5)	HPV-58	HPV-58
98N	A (3.285,9)	HPV-6B	HPV-6B
103N	B (1.695,6)	HPV-52	HPV-66
114N	B (1.616,7)	HPV-66	HPV-66
117N	B (1.398,5)	HPV-52	HPV-66
125N	B (2.906,0)	HPV-39-68	HPV-58 HPV-18
131N	A (2,9) B (2.038,8)	HPV-6B	HPV-66 HPV-18

152N	B (2.355,9)	HPV-58	HPV-58
161N	B (2.267,5)	HPV-11-18-54-69-70	HPV-18
169N	B (1.259,0)	HPV-MM8	HPV-16
186N	A (1568,2) B (2.507,5)	HPV-6B-16	HPV-6B HPV-58

* A = HPV de baixo risco; ** B = HPV de alto risco

RLU (Unidade de luz relativa)

Tabela 3 – Tipos de HPV detectados no sangue periférico no grupo de gestantes HIV-1 positivo sem infecção cervical causada pelo HPV (n=2)

Amostra	CH-II Cervical	PCR/RFLP Cervical	Nested-PCR/Seq Sangue
104N	Negativo	Negativo	HPV-11
128N	Negativo	Negativo	HPV-MM8

4.4 – Avaliação dos fatores de risco relacionados à invasão da corrente sangüínea pelo HPV

Devido à baixa frequência de DNA-HPV no sangue periférico no grupo de gestantes HIV-1 positivo sem infecção cervical provocada pelo HPV (n=2), optou-se por analisar a correlação entre os fatores de risco e a presença de DNA-HPV no sangue periférico para os dois grupos conjuntamente (n=110).

4.4.1 – Relação entre a presença do DNA-HPV no sangue periférico e níveis sangüíneos de linfócitos T CD4+ na gestação

O número de células CD4+ entre as 110 gestantes HIV-1 positivo variou entre 2 e 1.378 células/mm³, com média de 357,25 células/mm³. Vinte e sete (24,5%) pacientes tinham CD4+ menor ou igual a 200 células/mm³ e 83 (75,4%) superior a 200 células/mm³ (Tabela 4). Detectou-se o DNA-HPV no sangue periférico mais freqüentemente entre as pacientes com CD4+ menor ou igual a 200 células/mm³ (37,0%) quando comparado com as pacientes com níveis superiores a 200 células/mm³ (8,4%) ($p=0.0017$).

Tabela 4 – Associação dos níveis sangüíneos de células CD4+ segundo a presença ou ausência de DNA-HPV no sangue periférico em gestantes HIV-1 positivo (n=110)

CD4+	DNA-HPV Sangue		Total
	Positivo	Negativo	
≤ 200 céls/mm ³	10	17	27
> 200 céls/mm ³	7	76	83
Total	17	93	110

TESTE QUI-QUADRADO: $\chi^2=12.76$; GL=1; $p<0.0017$

4.4.2 – Relação entre DNA-HPV no sangue periférico e carga viral do HIV-1

A carga viral do HIV-1 entre as 110 gestantes HIV positivo variou entre < 80 e 490.000 cópias/mL, com média de 8.500 cópias/mL. Não se encontrou nenhuma associação significativa entre CV e presença de DNA-HPV no sangue periférico ($p=0.733$) (Tabela 5).

Tabela 5 – Carga viral plasmática do HIV-1 segundo a positividade de DNA-HPV no sangue periférico no grupo de gestantes HIV-1 positivo (n=110)

CV HIV-1	DNA-HPV Sangue	DNA-HPV Sangue	Total
	Positivo	Negativo	
< 80 cópias/mL	1	12	13
80–50.000 cópias/mL	11	59	70
> 50.000 cópias/mL	5	22	27
Total	17	93	110

TESTE EXATO DE FISHER: $p=0.733$

4.4.3 – Relação entre DNA-HPV no sangue periférico e carga viral do HPV cervical

Das 17 pacientes HIV-1 positivo com DNA-HPV detectado por Nested PCR no sangue periférico, 15 pacientes tinham carga viral do HPV cervical (CH-II) superior a 200 RLU (unidade de luz relativa) e 2 pacientes tinham carga viral do HPV cervical (CH-II) negativo ($p=0.001$) (Tabela 6).

Tabela 6 – Comparação da carga viral do HPV cervical com a positividade de DNA-HPV no sangue periférico no grupo de gestantes HIV-1 positivo (n=110)

CV HPV (CH-II)	DNA-HPV Sangue	DNA-HPV Sangue	Total
	Positivo	Negativo	
≤ 200 RLU	2	78	80
> 200 RLU	15	15	30
Total	17	93	110

TESTE EXATO DE FISHER: $p<0.001$

RLU (unidade de luz relativa)

4.4.4 – Relação entre DNA-HPV no sangue periférico e DSTs

Não se encontrou associação entre a presença do DNA-HPV no sangue periférico e a presença de outras DSTs. Das 17 pacientes HIV-1 positivo com DNA-HPV no sangue periférico, 10 pacientes apresentavam outras DSTs e 7, não ($p=0.205$) (Tabela 7).

Tabela 7 – Presença de DSTs segundo a presença de DNA-HPV no sangue periférico no grupo de gestantes HIV-1 positivo ($n=110$)

DSTs	DNA-HPV Sangue	DNA-HPV Sangue	Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	10	73	84
Negativo	7	20	26
Total	17	93	110

TESTE EXATO DE FISHER: $p=0.205$

4.4.5 – Relação entre DNA-HPV no sangue periférico e citologia oncótica

Das 15 pacientes HIV-1 positivo com infecção cervical positivo causada pelo HPV com DNA-HPV detectado por Nested PCR no sangue periférico, 12 pacientes tinham citologia oncótica alterada e 3 pacientes tinham citologia oncótica normal (Tabela A). Tabela A – Comparação da citologia oncótica com a positividade de DNA-HPV no sangue periférico no grupo de gestantes HIV-1 positivo ($n=110$)

CITOLOGIA ONCÓTICA	DNA-HPV Sangue	DNA-HPV Sangue	Total
	Positivo	Negativo	
Citologia Alterada	12	28	40
Citologia Normal	5	65	70
Total	17	93	110

TESTE EXATO DE FISHER: $p<0.001$

4.5 – Análise por regressão logística dos fatores de risco para presença de DNA-HPV no sangue periférico

Para analisar a relação entre os fatores de risco e a presença de DNA-HPV no sangue periférico utilizou-se a análise por regressão logística (Tabelas 8 e 9).

4.5.1 – Análise por regressão logística univariada

Pela análise de regressão logística univariada (Tabela 8), observou-se que as variáveis consideradas fatores de risco para a presença de DNA-HPV no sangue periférico nesta população de gestantes são: contagem de células de CD4+, infecção cervical causada pelo HPV e carga viral do HPV cervical.

Tabela 8 – Razões que possibilitam a ocorrência dos fatores estudados em relação à presença de DNA-HPV no sangue periférico em gestantes HIV-1 positivo (n=110) pela regressão logística univariada

NÍVEIS DE				
VARIÁVEL	COMPARAÇÃO*	P-VALOR	O.R.	IC 95% O.R.
Idade	≥30anos/<30anos	0.689	0.79	(0.26-2.45)
Número de CD4+ (cels/mm ³)	≤200/>200	<u>0.001</u>	<u>6.39</u>	(2.13-19.18)
Carga viral do HIV-1 (cópias/mL)	80-50000/<80	0.461	2.24	(0.26-19.0)
	>50000/<80	0.384	2.73	(0.29-26.12)
HPV cervical	<u>Sim/não</u>	<u>0.008</u>	<u>8.00</u>	(1.73-36.96)
Carga viral do HPV (RLU)	<u>>200/<200</u>	<u><0.001</u>	<u>24.0</u>	(4.92-117.13)
Presença de DSTs	Sim/Não	0.173	0.46	(0.15-1.41)
Citologia Oncótica	<u>Alterada/Normal</u>	<u><0.001</u>	<u>9.35</u>	(2.93 – 29.78)

OR (Odds Ratio) = Razão de risco para a presença de DNA-HPV no sangue periférico; (n=17 DNA-HPV positivo e n=93 HPV-DNA negativo)

IC 95% OR = Intervalo de 95% de confiança para a razão de risco.

* nível de comparação/nível de referência.

RLU (unidade de luz relativa)

4.5.2 – Análise por regressão logística multivariada

Considerando todas as variáveis anteriores e usando o critério Stepwise de seleção de variáveis, observa-se que foram significativas as variáveis carga viral do HPV cervical e a contagem de células CD4+. As pacientes com contagem de células CD4+ inferior ou igual a 200 células/mm³ corriam 4,1 vezes mais risco de ter o DNA-HPV no sangue periférico. A carga viral do HPV cervical superior a 200 RLU aumenta 18,30 vezes o risco de a paciente ter DNA-HPV no sangue periférico.

Tabela 9 – Razões que possibilitam a ocorrência dos fatores estudados em relação à presença de DNA-HPV no sangue periférico em gestantes HIV-1 positivo (n=110) pela regressão logística multivariada

NÍVEIS DE				
VARIÁVEL	COMPARAÇÃO*	P-VALOR	O.R.	IC 95% O.R.
Número de CD4+ (cels/mm ³)	<u>≤200/>200</u>	<u>0.047</u>	<u>4.08</u>	(1.02-16.29)
Carga viral do HPV (RLU)	<u>>200/<200</u>	<u><0.001</u>	<u>18.30</u>	(3.61-92.89)

OR (Odds Ratio) = Razão de risco para a presença de DNA-HPV no sangue periférico; (n=17 DNA-HPV positivo e n=93 HPV-DNA negativo)

IC 95% OR = Intervalo de 95% de confiança para a razão de risco.

* nível de comparação/nível de referência.

RLU (unidade de luz relativa)

5 – DISCUSSÃO

Sabe-se que a maioria dos casos de câncer do colo uterino está associada à infecção cervical provocada pelo HPV (Walboomers *et al.*, 1999). Na literatura mundial há alguns estudos em pacientes com câncer cervical que tinham o DNA-HPV não somente no colo uterino, mas também no sangue periférico, plasma ou soro (Pornthanakasem *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2002; Sathish *et al.*, 2004; Widschwendter *et al.*, 2004; Kay *et al.*, 2005). Essas pesquisas raramente mostraram o HPV no sangue de pacientes controle sem lesões invasivas. Além disso, o DNA-HPV também já foi identificado em tecido mamário de pacientes com câncer de mama e de colo uterino, o que sugere uma possível disseminação hematogênica de DNA-HPV maligno (Henning *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2000; Widschwendter *et al.*, 2004).

Além disso, a infecção causada pelo HIV pode modificar o curso natural de outras doenças sexualmente transmissíveis, entre elas a infecção genital provocada pelo HPV, tornando-as mais difíceis de controlar. A infecção causada pelo HPV na mulher HIV soropositivo é mais freqüente, persistente e resistente a tratamento, e evolui rapidamente para lesões mais graves (Sun *et al.*, 1997; Chiasson *et al.*, 1997; Maiman *et al.*, 1998).

Os dados acima motivaram-nos a estudar a prevalência de DNA-HPV no sangue periférico de mulheres portadoras do HIV-1. As participantes deste estudo foram selecionadas de um corte prospectivo de gestantes HIV-1 positivo, conduzido para se determinar a prevalência do HPV cervical e a persistência do mesmo depois do parto (Mota, 2002). Das 188 gestantes HIV-1 positivo inicialmente estudadas, 53% tinham infecção cervical causada pelo HPV. A seleção das pacientes para esse estudo baseou-se na disponibilidade de amostra de sangue em nosso laboratório, colhida na mesma data

em que o material de colo cervical foi coletado para a pesquisa do DNA-HPV. No total, 110 pacientes foram incluídas neste estudo, e dessas 60 (54,5%) tinham infecção cervical provocada pelo HPV.

Pesquisas demonstram que as taxas de prevalência de DNA no sangue de pacientes com câncer de colo uterino são bastante variadas: 11,8%; 12,0%; 24,1%; 24,4%; e 45% (Sathish *et al* (2004); Pornthanakasem *et al* (2001), Hsu *et al* (2003); Kay *et al* (2005); e Widschwendter *et al* (2003), respectivamente). Esse fato tem sido atribuído ao uso de diferentes *primers* e às populações estudadas. Acreditamos que este trabalho seja o primeiro que aborda o encontro do DNA-HPV em portadoras do HIV. A prevalência geral do HPV no sangue de gestantes HIV-1 positivo foi 15,4% (17/110) enquanto que no subgrupo das mulheres com infecção cervical causada pelo HPV a prevalência foi 25% (15/60).

Nas pacientes com infecção cervical causada pelo HPV, a prevalência foi bastante semelhante a encontrada por Kay *et al* (2005) no grupo de 118 mulheres com câncer invasivo de colo uterino, em diferentes graus. No entanto, no grupo de pacientes com infecção cervical provocada pelo HPV 16/18, porém sem câncer invasivo (citologia normal ou com lesões pré-cancerosas), esses autores não detectaram o HPV no sangue de nenhuma das 32 mulheres estudadas. Nenhuma das pacientes do nosso estudo tinham carcinoma invasivo. Assim, parece-nos intuitivo formular a hipótese de que, de alguma maneira, a infecção causada pelo HIV, além de estar associada com maior frequência e persistência ao HPV no colo cervical, também influencia a invasão da corrente sangüínea pelo HPV em pacientes com HPV cervical.

A prevalência do HPV no sangue periférico de mulheres com infecção cervical causada pelo HIV (25%) foi significativamente mais alta do que no grupo das mulheres

sem infecção cervical provocada pelo HPV (4,0%) ($p=0.02$). Neste último, duas pacientes tinham o HPV no sangue, embora a pesquisa de DNA HPV cervical tenha sido negativa pelos métodos de PCR e captura híbrida. Esse achado, embora inesperado, não é sem precedentes. Ong *et al* (2002) e Kay *et al* (2005), em estudos para detectar o HPV no sangue de pacientes com carcinoma cervical, encontraram o HPV 16 no sangue de uma paciente controle (1 de 60 e 1 de 77, respectivamente) que era negativa para pesquisa HPV cervical e cuja citologia oncológica era normal. A presença do HPV no sangue de pacientes sem infecção cervical causada pelo HPV pode ser consequência da contaminação na reação de PCR, embora isso seja pouco provável, pois os controles negativos estavam adequados em todas os experimentos realizados e as amostras tiveram os seus resultados repetidos e confirmados. Uma outra possibilidade é o resultado ser falso-negativo na pesquisa do HPV, devido à coleta inadequada de material cervical, embora a reação de PCR para *primers* controle (beta-globina) tenha sido satisfatória. Também não se pode excluir a hipótese de clareamento de uma infecção cervical pregressa, visto que muitas infecções causadas pelo HPV são apenas transitórias. Kay *et al* aventaram a possibilidade remota de uma patologia associada ao HPV em sítios não cervicais. Infelizmente, as duas pacientes com HPV no sangue, porém com pesquisa negativa no colo uterino, não compareceram às consultas pós-natal e não dispomos de outra amostra do sangue, o que nos impede de repetir o teste em uma segunda amostra.

Sahish *et al* (2004) encontraram o DNA-HPV no sangue de 8 (11.8%) pacientes com câncer invasivo de colo de útero, e em todas elas pacientes o tipo identificado no sangue também estava no tecido cervical. Neste estudo, a mesma metodologia, amplificação por PCR seguida de RFLP, foi utilizada para a tipagem do HPV. Widschwendter *et al* (2003) demonstraram a presença de HPV-16 no tecido cervical, no

tecido mamário e no soro em uma paciente com histórico de câncer cervical associado a um câncer secundário de mama. Deste modo, parece intuitiva a hipótese de o HPV ser transportado pela corrente sangüínea, a partir de tumor, e se instalar em diferentes locais do corpo onde favoreceriam o desenvolvimento de uma nova lesão. A possibilidade de os HPVs serem transportados pelo sangue periférico e participarem no desenvolvimento de tumores em diferentes órgãos poderia explicar a presença de DNA-HPV nos tumores do fígado (Drut *et al*, 1998; Scinicariello *et al*, 1992) e tumores de mama (Yu *et al*, 2000; Hennig *et al*, 1999; Yu *et al*, 1999; Widschwendter *et al*, 2004).

Em nosso estudo, o tipo de HPV identificado no sangue foi também identificado no raspado cervical em 9 das 15 (60%) pacientes com infecção cervical causada pelo HPV e DNA-HPV presentes no sangue. Estes resultados, embora inesperados, assemelham-se aos reportados por Dong *et al* (2002), que encontraram concordância entre os tipos de HPV detectados no sangue e no colo uterino em 64,3% dos pacientes com câncer cervical. Em 6 de nossas pacientes, o tipo identificado no sangue não foi identificado no colo uterino. Para identificar o tipo de HPV detectado no sangue, as amostras positivas foram submetidas à reação de sequenciamento, enquanto a identificação no HPV cervical ocorreu por PCR/RFLP. Acreditamos que a discrepância observada entre os tipos de HPV identificados no sangue periférico, e no trato genital, das 6 pacientes restantes seja uma falha na detecção da reação de amplificação ou na classificação de HPV pela técnica de RFLP. Observou-se que vários tipos de HPV foram identificados em uma mesma paciente, pois uma infecção causada por múltiplos tipos de HPV na mulher portadora do HIV não é incomum. Isso torna mais complexa a interpretação de um resultado gerado por RFLP. O que não se sabe é se, nessas pacientes, o encontro de um único tipo de HPV no sangue periférico reflete a realidade ou se resulta de limitação da reação de sequenciamento. Em

três pacientes (125N, 131N e 186N) foram identificados dois tipos de HPV no sangue periférico. Estas amostras, através do sequenciamento, tinham um alto número de ambigüidades, principalmente do tipo majoritário, o que sugere a presença de mais de um tipo viral. Utilizando-se a técnica da diluição limite final, foi possível amplificar apenas uma molécula de DNA-HPV por tubo, facilitando a análise mais detalhada da população viral.

Ao analisarmos a influência da imunossupressão entre as gestantes HIV-1 positivo, observamos que as pacientes com alteração nos níveis de contagem de células T CD4+ (≤ 200 cels/mm³) tiveram uma taxa do DNA-HPV no sangue periférico significativamente mais elevada que aquelas sem alteração imunológica ($p < 0.0017$) (Tabela 4). Acreditamos que esses resultados possam refletir a realidade, pois em outras populações de infectados pelo HIV-1 a relação entre baixos níveis de células T CD4+ e o aumento de infecção cervical provocada pelo HPV tem sido largamente mencionada na última década (Palefsky *et al*, 2001; Ahdieh *et al*, 2001; Palefsky *et al*, 1999).

Estudos epidemiológicos baseados em biologia molecular demonstraram a presença de vários tipos de HPV em uma mesma amostra cervical entre as mulheres HIV-1 positiva (Gonçalves *et al*, 1999; Levi *et al*, 2002, Mota, 2002). Os tipos de alto risco foram os mais comumente encontrados nas pacientes imunossuprimidas, que costumam evoluir para doença intra-epitelial mais grave induzida pelo HPV, com maior tempo de persistência da infecção cervical com fracasso terapêutico (Ahdieh *et al*, 2000). Assim, a persistência do vírus, associada à imunossupressão prolongada, poderia explicar a maior prevalência de DNA-HPV no sangue periférico entre as gestantes HIV-1 positivo com infecção cervical causada pelo HPV.

Muitos estudos mostraram a associação entre a infecção provocada pelo HPV e o reduzido número de linfócitos CD4+ em pacientes HIV soropositivas; porém, Palefsky *et al*

(1999) foram os primeiros a relacionar esta infecção com a carga viral plasmática do HIV. Massad *et al* (1998) consideram a alta carga viral de HIV u fator independente de risco para infecção causada elo HPV, em especial quando manifestada como lesão intra-epitelial ou invasora. Em nosso estudo, não se observou uma associação entre a carga viral plasmática de HIV-1 com a presença de DNA-HPV no sangue periférico entre as gestantes.

A maioria dos estudos sobre pesquisa do DNA-HPV no sangue foram realizados em pacientes com câncer de colo de útero. Nesses estudos, na ausência de lesões invasivas, não se detectou DNA HPV circulante. Nossos achados diferem desses estudos, pois nenhuma das pacientes investigadas apresentava lesões invasivas. Doze das 15 gestantes com DNA-HPV no sangue e no colo de útero, apresentavam lesões precursoras de câncer do colo (5LIEBG e 7 LIEAG). Isso indica que algum outro fator específico para essa população de portadoras do HIV, como por exemplo, presença de imunossupressão, pode facilitar a invasão da corrente sanguínea pelo HPV mesmo na ausência de lesões invasivas no colo de útero. Outro dado importante apresentado pelas 15 gestantes refere-se aos resultados de carga viral do HPV no colo do útero. Todas as pacientes apresentavam níveis de leitura de DNA-HPV (CH-II) bastante elevados, superiores a 200 RLU, sugerindo que a alta carga viral também poderia atuar como fator de risco para a presença de DNA-HPV no sangue. Em relação à infecção por HPV no colo de útero, já foi sugerido que a presença de altas cargas virais poderia predizer a evolução das lesões precursoras do câncer do colo do útero, ressaltando que a baixa carga viral não exclui definitivamente a possibilidade de a doença progredir (Dalstein *et al*, 2003).

A análise multivariada por regressão logística dos fatores de risco para a presença de HPV no sangue periférico foi realizada para o grupo de portadoras do HIV como um todo. Observou-se que os fatores de risco para a invasão da corrente sanguínea pelo DNA-HPV foram: alta carga viral de HPV no colo uterino (teste de captura híbrida superior a 200 RLU) e contagem de células CD4+ inferior a 200 células/mm³ (Tabela 9). As gestantes com contagem de células CD4+ inferior ou igual a 200 células/mm³ apresentaram 4.08 vezes mais riscos de ter DNA-HPV no sangue periférico do que as com CD4+ superior a 200 células/mm³, enquanto a presença de carga viral do HPV cervical superior a 200 RLU aumentou 18.30 vezes o risco de ter DNA-HPV no sangue periférico. Como se adotou o critério de seleção *stepwise*, a variável presença de HPV em colo cervical não pode ser considerada no modelo, pois apresentou colinearidade com a variável carga viral do HPV.

Finalmente, esse estudo mostrou alguns dados de extrema importância para o conhecimento da história natural das infecções causadas pelo HPV. Gestantes HIV-1 positivo com lesões intra-epiteliais pré-neoplásicas, a alta carga viral de HPV cervical e a imunossupressão indicam uma maior probabilidade de haver DNA-HPV no sangue periférico. Assim, os achados obtidos sugerem que outros estudos, evidenciando a presença de DNA-HPV em células não epiteliais, devem ser desenvolvidos com a finalidade de tornar estes dados mais consistentes. O significado da detecção do HPV no sistema circulatório não está esclarecido, pois o meio de disseminar o câncer cervical é através dos tecidos adjacentes ou da drenagem de gânglios linfático. Porém, metástases a distância podem ocorrer, como nos pulmões (DiSaia *et al*, 1997), e no tecido mamário (Yu *et al*, 2000; Hennig *et al*, 1999; Yu *et al*, 1999; Widschwendter *et al*, 2004). Poderíamos considerar a hipótese de que mulheres com DNA-HPV circulante no sangue, infectadas

pelo HIV, em estado de imunodepressão, estariam sujeitas a desenvolver lesões malignas. Como a maioria das pacientes por nós estudada retornou aos serviços de atendimento anteriores, não foi possível fazer um acompanhamento clínico e laboratorial das mesmas para se determinar o significado de achado de HPV no sangue periférico. O estudo de Kay *et al* sugere que o encontro do DNA-HPV no sangue periférico de pacientes com câncer invasivo não tem valor diagnóstico de câncer invasivo de colo de útero, já que apenas uma pequena porcentagem de pacientes apresentou DNA-HPV na circulação, e este foi detectado predominantemente nas pacientes em estágios avançados das lesões. No entanto, a presença de DNA-HPV na circulação talvez possa ser útil como indicador de mulheres que correm o risco de desenvolver metástases a distância. No entanto, estudos de acompanhamento de longo tempo são necessários para elucidar essa possibilidade.

6 – CONCLUSÃO

1) Detectou-se DNA-HPV no sangue periférico em 15,4% das gestantes portadoras do HIV-1. A prevalência de DNA-HPV no sangue das gestantes HIV-1 positivo com infecção cervical causada pelo HPV (25,0%) foi significativamente maior do que nas gestantes HIV-1 positivo sem infecção cervical provocada pelo HPV (4%) ($p=0.02$).

2) Foram encontrados 6 tipos distintos de HPV no sangue das gestantes HIV-1 positivo com infecção cervical causada pelo HPV, sendo mais freqüentes os tipos HPV-58 e HPV-66. Foram encontrados 2 tipos distintos de HPV (HPV-11 e MM8) no sangue das gestantes HIV-1 positivo sem infecção cervical provocada pelo HPV.

3) Pela análise univariada, foram considerados como fatores de risco para presença de DNA-HPV: presença de infecção cervical pelo HPV ($p=0.002$), contagens de $CD4^+ \leq 200$ cels/mm³ ($p<0.001$), presença de alta carga viral do HPV cervical ($p<0.001$) e citologia oncótica alterada ($p<0.001$). Pela análise de regressão logística multivariada, utilizando-se o critério *stepwise* de seleção de variáveis, presença de altas cargas virais do HPV no colo uterino ($p<0.001$) e baixas contagens de $CD4^+$ ($p=0.047$) foram consideradas fatores de risco independentes para a presença de DNA-HPV na circulação sangüínea. Verificou-se que as pacientes HIV soropositivas com maior risco de presença de HPV no sangue periférico são as com carga viral de HPV cervical acima de 200 RLU (OR=18.30, IC 95% 3,61-92,89) e com contagens de $CD4^+ \leq 200$ cels/mm³ (OR= 4.08, IC95% 1,02-16,29).

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHDIEH, L., MUÑOZ, A., VLAHOV, D., TRIMBLE, C. L., TIMPSON, L. A., SHAH, K. Cervical neoplasia and repeated positivity of women papillomavirus infection in women immunodeficiency virus-seropositive and seronegative women. **Am. J. Epidemiol**, v. 151, p. 1148-57, 2000.

AHDIEH, L., KLEIN, R. S., BURK, R., CU-UVIN, S., SCHUMAN, P., DUERR, A., SAFAEIAN, M., ASTEMBORSKI, J., DANIEL, R., SHAH, K. Prevalence, Incidence and type-specific persistence of human papillomavirus in human immunodeficiency virus (HIV) positive and HIV negative women. **J. Infect. Dis.** v. 184, n. 6, p. 682-90, 2001.

ARMBRUSTER-MORAES, E., IOSHIMOTO, L. M., LEO, E., ZUGAIB, M. Presence of human papillomavirus DNA in amniotic fluids of pregnant women with cervical lesions. **Gynecol Oncol.**, v. 54, n. 2, p. 152-158, 1994.

ARANY, I. & TYRING, S. K. Systemic immunosuppression by HIV infection influences HPV transcription and thus local immune responses in condyloma acuminatum. **Int. J. STD. AIDS.** v. 5, p. 268-71, 1998.

BAFVERSTEDT, B. Condylomata acuminata Past and present. **Acta Derm. Venereol.** V.47, p. 376-381, 1967.

BAUER, H. M., TING, Y., GREER, C. E., CHAMBERS, J. C., TASHIRO, C. J., CHIMERA, J. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by PCR-based method. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 265, p. 472-477, 1991.

BAUER, H. M., HILDESHEIM, A., SCHIFFMAN, M. H., GLASS, ^a G., RUSH, B. B., SCOTT, D. R., CADELL, D. M., KURMAN, R. J., MANOS, M. M. Determinants of genital

human papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. **Sex Transm Dis**, v. 20, p. 247-278, 1993.

BARBOSA, M. S., SCHLEGEL, R. The E6 and E7 genes of HOV-18 are sufficient for inducing two-stage *in vitro* transformation of human keratinocytes. **Oncogene**, v. 4, p. 1529-1532, 1989.

BERGERON, C., FERENCZY, A., RICHART, R. Underwear: contamination by human papillomavirus. **Am J Obstet Gynecol**, v. 162, p. 25, 1990.

BERNARD, H. U., CHAN, S. Y., MANOS, M. M., ONG, C. K., VILLA, L. L., DELIUS, H., PEYTON, C. L., BAUER, H. M., WHEELER, C. H. 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**, v. 170, p. 1077-85, 1994.

BOSCH, F. X. et al., Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. **J Natl Cancer Inst**, v. 87, p. 796-802, 1995.

BOSCH, F. X., MUÑOZ, N., DE SANJOSE. S. Human papillomavirus and other risk factors for cervical cancer. **Biomed Pharmacother**, v. 51, p. 268-275, 1997.

BOUVARD, V., STOREY, S. A., PIM, D., BANKS, L., Characterization of human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. **EMBO J**, v. 13, p. 5451-5459, 1994.

BRINTON, L. A. The male factor in the etiology of cervical cancer among sexually monogamous women. **Int J Cancer**. V. 44, p. 199-203, 1989.

BROWN, D. R., BRYAN, J. T., WOOLS, K., RODRIGUES, M., TYRING, S. Detection of human papillomavirus L1 protein in condylomata from adults with defects in cell-mediated immunity. **J. Med. Virol.**, v. 41, p. 79-84, 1993.

BROWN, D. R., BRYAN, J. T., CRAMER, H., KATZ, B. P., HANDY, V., FIFE, K. H. Detection of multiple human papillomavirus types in condyloma acuminata from immunosuppressed patients. **J. Infect. Dis.**, v. 170, p. 759-765, 1994.

CAMPO, M.S.; O'NEIL, B.W.; BARRON, R.J.; JARREF, W.F. Experimental reproduction of the papilloma carcinoma complex of the alimentary canal in cattle. **Carcinogenesis**, v. 15, n. 8, p. 1597-601, 1994.

CAPONE, R. B., PAI, S. I., KOCH, W. M., GILLISON, M. L., DANISH, H. N., WESTRA, W. H., DANIEL, R., SHAD, K. V., SIDRANSKY, D. Detection and quantification of human papillomavirus DNA in the sera of patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 4171-4175, 2000.

CAROLE, E. E., CAVALIERE, M. J., SHIRATA, N. K., ARAUJO, M. F. Papillomavirus in cervicovaginal smears of women infected with human immunodeficiency virus. **São Paulo Med. J.**, v.113, n. 6, p. 1009-1, 1995.

CAROLE, E. E., CAVALIERE, M. J., CAROLE, N. M. Squamous intraepithelial lesions in cervical smears of human immunodeficiency virus-seropositive adolescents. **Diagn. Cytopathol.**, v. 18, p. 91-92, 1998.

CARSON, L. F., TWIGGS, L. B., FUKUSHIMA, M., OSTROW, R. S., FARAS, A. J., OKAGAKI, T. Human genital papilloma infections: an evaluation of immunologic competence in the genital neoplasia-papilloma syndrome. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 155, p. 784-789, 1986.

CASON, J., KAYE, J. N., JEWERS, R. J., KAMBO, P. K., BIBLE, J. M., KELL, B., SHERGILL, B., PAKARIAN, F., RAJU, K. S., BEST, J. M. Perinatal infection and persistence of human papillomavirus types 16 and 18 in infants. **J. Med. Virol.** v. 47, p. 209-18, 1995.

CASTILHO, E. A.A. & CHEQUER, P. A., A epidemia de AIDS no Brasil. In: Brasil. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de AIDS e DST – **Simpósio Satélite: a epidemia da AIDS no Brasil: situação e tendências.** Brasília, Ministério da Saúde, 1996, p. 9-14.

CAUSSY, D., GOEDERT, J. J., PALESFSKY, J., GONZALES, J., RABKIN, C. S. DIGIOIA, R. A., SANCHEZ, W. C., GROSSMAN, R. J., COLCLOUGH, G., WIKTOR, S. Z., KRAMER, A., BIGGAR, R. J., BLATTNER, W. A. Interaction of human immunodeficiency and papillomaviruses: association with anal epithelial abnormality in homosexual men. **Int. J. Cancer**, v. 46, p. 214-219, 1990.

CHEN, E. Y.; HOWLEY, P. M.; LEVINSON, A D.; SEEBURG, P. H. The primary structure and genetic organization of bovine papillomavirus (BPV) type 1 genome. **Nature**, v. 299, p. 529-534, 1982.

CHIANG, C. M., USTAV, M., STENLUND, A., HO, T. F., BROKER, T. R., CHOW, L. T. Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillaviral origins, **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 80, p. 5799-5803, 1992.

CHIASSEON MA, ELLERBROCK TV, BUSH TJ, SUN XW, WRIGHT TC JR. Increased prevalence of vulvovaginal condyloma and vulvar intraepithelial neoplasia in women infected with the human immunodeficiency virus. **Obstet Gynecol.** v. 89, n. 5, p. 690-4, 1997.

CHOPRA, K. F. & TRING, S. K. The impact of the human immunodeficiency virus on the human papillomavirus epidemic. **Arch. Dermatol.** v. 133, p. 629-33, 1997.

CRAWFORD, L. V. CRAWFORD, E. M. A compative study of polyoma viruses. **Virology**, v. 21, p. 258-263, 1963.

DALSTEIN V, RIETHMULLER D, PRETET JL, LE BAIL CARVAL K, SAUTIERE JL, CARBILLET JP, KANTELIP B, SCHAAL JP, MOUGIN C. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. **Int J Cancer**. v. 106, n. 3, p. 396-403, 2003.

DELGADO, G. Papillomavirus y Cancer Cervical. **Acta Canc**, v. 3, p. 25-32, 1993.

DE VILLIERS, E. M. Taxonomic classification of human papillomaviruses. **Papillomavirus Report**, v. 12, p. 57-63, 2001.

DI SAIA, P. J.; CREASMAN, W. T., Clinical gynecologic oncology. 5th edition. Missouri: Mosby-Year Book, Inc. 1997.

DRUT R., DRUT R.M., GÓMEZ M.A., RÚA E.C., LOJO M.M. Presence of Human Papillomavirus in Extrahepatic Biliary Atresia. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. v. 27, p. 530-535, 1998.

DONG, S. M., PAI, S. I., RHA, S. H., HILDESHEIM, A., KURMAN, R. J., SCHWARTZ, P. E., MORTEL, R., MCGOWAN, L., GREENBERG, M. D., BARNES, W. A., SIDRANSKY, D. Detecton and quantification of human papillomavirus DNA in the plasma of cercical patients with cervical carcinoma. **Cancer Epidemiologic Biomarkers & Prevention**. v.. 11, p. 3-6, 2002.

ELLERBROCK, T. V., CHIASSEON, M. A., BUSH, T. J., SUN, X. W., SAWO, D., BRUDNEY, K., WRIGHT, T. C. Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV infected women. **JAMA**. v. 283, p. 1037-7, 2000.

FAVRE, M.; ORTH, G.; CROISSANT, °; YANIV, M. Human papillomavirus DNA:physical mapping of the cleavage sites of *Bacillus amyloliquefaciens* (Bam I) and *Haemophilus parainfluenzae* (Hpa II) endonucleases and evidence for partial heterogeneity. **J Virol**, v. 2, p. 1210-1214, 1977.

FRANCO, E. L. Cancer causes revisited: human papillomavirus and cervical neoplasia. **Natl Cancer Inst**, v.87, p. 779-780, 1995.

GARZETTI, G. G., CIAVATTINI, A., BUTINI, L., VECCHI, A. MONTRONI, M. Cervical dysplasia in HIV-seropositive women: role of human papillomavirus infection and immune status. **Gyneacol. Obstet. Invest.**, v. 40, p. 52-56, 1995.

GONCALVES MA, MASSAD E, BURATTINI MN, VILLA LL. Relationship between human papillomavirus (HPV) genotyping and genital neoplasia in HIV-positive patients of Santos City, Sao Paulo, Brazil. **Int J STD AIDS**. v. 10, n. 12, p. 803-7, 1999.

HAWLEY-NELSON P, VOUSDEN KH, HUBBERT NL, LOWY DR, SCHILLER JT. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. **EMBO J**. v. 8, n. 12, p. 3905-10, 1989.

HENNIG,E.M., SUO,Z., THORESEN,S., HOLM,R., KVINNSLAND,S., NESLAND,J.M., Human papillomavirus 16 in breast cancer of women treated for high grede cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). **Breast Cancer Res. Treat. Jan.**, p. 53, n. 2, p. 121-35, 1999.

HENRY, M. J., STANLEY, M.W., CRUIKSHANK, S., CARSON, L. Association of human immunodeficiency virus induced immunossupression with human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia. **Am. J. Obstet. Gyneacol**. v. 160, p. 352-363, 1989.

HOWLEY, P. M. Papillomavirinae: The viruses and their replication. In: Fundamental Virology, 3th ed., Philadelphia: Lippincott-Raven, p. 2045-2109, 1996.

HSU, K. F., HUANG, S. C., HSIAO, J. R., CHENG, Y. M., WANG, S. P. H., CHOU, C. Y. Clinical significance of serum human papillomavirus DNA in cervical carcinoma. **Obstetrics & Gynecology**. v. 102, n. 6, p. 1344-1348, 2003.

IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER WORLD HEALTH ORGANIZATION,. Monographs on the evaluation of carcinogenesis risks to humans. Human papillomaviruses. Lyon, France: Human Papillomavirus, 1995, v. 64

IFTNER, T., VILLA, L. L. Chapter 12: Human Papillomavirus technologies. **J. Natl. Cancer Inst. Monog.** v. 31, p. 80-80, 2003.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil,. Rio de Janeiro, 2001.

JACOBS, M. V., de RODA HUSMAN, A. M., VAN DEN BRULE, A. J., SNIJDERS, P. J. F., MEIJER, C. J. L., Group-specific differentiation between high and low risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 901-905, 1995.

JOSEFSSON A, MELBYE M, SORENSEN P, FRISCH M, ANDERSEN PK, SPAREN P, GUSTAFSSON M, MAGNUSSON P, PONTEN J, GYLLENSTEN U, ADAMI HO. A prospective study showing long-term infection with human papillomavirus 16 before the development of cervical carcinoma in situ. **Cancer Res.** v. 60, n. 21, p. 6027-32, 2000.

KARAS, Z., POREBA, E. HPV sequences in blood of patients with condyloma acuminata. **J. Invest. Dermatol.** v. 110, p. 843-4, 1998.

KAY P, ALLAN B, DENNY L, HOFFMAN M, WILLIAMSON AL. Detection of HPV 16 and HPV 18 DNA in the blood of patients with cervical cancer. **J Med Virol.** v. 75, n. 3, p. 435-9, 2005.

KAYE JN, CASON J, PAKARIAN FB, JEWERS RJ, KELL B, BIBLE J, RAJU KS, BEST JM. Viral load as a determinant for transmission of human papillomavirus type 16 from mother to child. **J Med Virol.** v. 44, n. 4, p. 415-21, 1994.

KLEIN, R. S., HO, G. Y. F., VERMUND, S. H., FLEMING, I., BURK, R. D. Risk factors for squamous intraepithelial lesions on pap smear in women at risk for human immunodeficiency virus infection. **J. Infect. Dis.**, v. 170, p. 1404-9, 1994.

KORN, A. P., AUTRY, M., DEREMER, P. A., TAN, W. Sensitivity of the Papanicolau smear in human immunodeficiency virus-infected women. **Obstet. Gynecol.**, v. 83, p. 401-404, 1994.

KUHN, L., SUN, X. W., WRIGHT, T. C., Human immunodeficiency virus infection and female lower genital tract malignancy. **Curr. Opin. Obstet. Gynecol.**, v. 11, p. 35-39, 1999.

KURMAN, R.J. & SOLOMON, D. The Bethesda System for Reporting, Cervical/Vaginal Cytologic Diagnoses. Definition, Criteria and Explanation Notes for Terminology and Specimen Adequacy. **New York, Springer-Verlag.**, p. 81, 1997.

LEVI JE, CONTRI DG, LIMA LP, TAKAOKA DT, GARRINI RH, SANTOS W, FACHINI R, WENDEL S. High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus RNA among Brazilian blood donors. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** v. 45, n. 2, p. 75-8, 2003.

LORINCZ, A. T., GOLDSBOROUGH, M. D., MCALLISTRE, P., REID, R., TEMPLE, G. A comparison study of human papillomavirus prevalence by the polymerase chain

reaction in low risk women and in a gynaecology referral group at elevated risk for cervical cancer. **Mol. Cell. Probes.**, v. 6, n.6, p. 451-457, 1992.

MANOS, M., TING, Y., WRIGHT, D., LEWIS, A., BROKER, T., WOLINSKY, S. Use of polymerase chain reaction amplification of genital human papillomaviruses. **Cancer Cells.** v. 7, p.209-214, 1989.

MAIMAN, M., TARRICONE, N., VIEIRA, J. A., SUAREZ, J., SERUR, E., BOYCE, J. G. Colposcopic evaluation of human immunodeficiency virus-seropositive women. **Obstet. Gynecol.**, v. 78, p. 84-88, 1991.

MAIMAN, M. Management of cervical neoplasia in human immunodeficiency virus-infected women. **J. Natl. Cancer Inst. Monogr.**, v. 23, p. 43-49, 1998.

MARTINS, N. V. & PEREYRA, E. G. P. **Conhecendo o HPV – Patologia do trato genital inferior, Colposcopia e CAF.** São Paulo, Frontis Editorial, p. 155, 2000.

MASSAD LS, RIESTER KA, ANASTOS KM, FRUCHTER RG, PALEFSKY JM, BURK RD, BURNS D, GREENBLATT RM, MUDERSPACH LI, MIOTTI P. Prevalence and predictors of squamous cell abnormalities in Papanicolaou smears from women infected with HIV-1. Women's Interagency HIV Study Group. **J Acquir Immune Defic Syndr.** v. 21, n. 1,p. 33-41, 1999.

MIOTTI, P. G., DALLABETA, G. A., DANIEL, R. W., CANNER, J. K., CHIPHANGWI, J. D., LIOMBA, G. N., YANG, L., SHAH, K. V. Cervical abnormalities, human papillomavirus and immunodeficiency virus papillomaviruses. **Int. J. Gynecol. Obstet.** v. 54, p. 125-130, 1996.

MORENO, V., BOSCH, F. X., MUÑOZ, N., MEIJER, C. J., SAHAH, K. V., WALBOOMERS, J. M. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women

with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. **Lancet**, v. 359, p. 1085-1092, 2002.

MOTA, G. R., Detection and characterization of human papillomavirus types in pregnant women infected by the human immunodeficiency virus (HIV-1). Tese de Doutorado apresentado à Universidade Federal de São Paulo, 2003.

MUNGER, K., WERNESS, B. A., DYSON, N., PHELPS, W. C., HARLOW, E., HOWLEY, P. M. Complex formation of human papillomavirus R7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. **EMBO J**, v. 8, p. 4099-4105, 1989.

MUNOZ, N., FRANCESCHI, S., BOSETTI, C., MORENO, V., HERRERO, R., SMITH, J. S. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. **Lancet**, v. 359, p. 1093-1101, 2002.

MUNOZ, N., BOSH, F. X., de SANJOSE, S., HERRERO, R., CASTELLSAGUE, X., SHAH, K. V., SNIJDERS, P. J., MEIJER, C. J., Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **New England Journal of Med.**, v. 348, p. 518-527, 2003.

NASIR, L.; MCFARLANE, S.T.; TORRONTAGUI, B.O.; REID, S. W. Screening for bovine papillomavirus in peripheral blood cells of donkeys with and without sarcoids. **Res. Vet. Sci.**, v. 63, n. 3, p. 289-290, 1997.

Oriel, J. D. Natural History of genital warts. **Brit J Vener Dis**, v. 47, p. 1-13, 1971.

PALEFSKY JM, MINKOFF H, KALISH LA, LEVINE A, SACKS HS, GARCIA P, YOUNG M, MELNICK S, MIOTTI P, BURK R. Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. **J Natl Cancer Inst.** v. 91, n. 3, p. 226-36, 1999.

PALEFSKY JM, HOLLY EA, RALSTON ML, DA COSTA M, GREENBLATT RM. Prevalence and risk factors for anal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. **J Infect Dis.** v. 183, n. 3, p. 383-91, 2001.

PAPANICOLAU, G.N. The sexual cycle in the human female as revealed by vaginal smears. *American J. of Anatomy.* v.52, p. 519-611, 1933.

PAO, C. C., LIN, S. S., LIN, C. Y., MAA, J. S., LAI, C. H., HSIEH, T. T. Identification of human papillomavirus DNA sequences in peripheral blood mononuclear cells. *Am.J.Clin. Pathol.* v. 95, n. 4, p. 540-6, 1991.

PFISTER, H. Biology and Biochemistry of Papillomavirus. **Biochem. Pharmacol.** n.99, p. 111-167, 1984.

PORNTHANAKASEM, W., SHOTELERSUK, K., TERMRUANGLERT, W., VORAVUD, N., NIRUTHISARD, S., MUTIRANGURA, ^a Human papillomavirus DNA in plasma of patients with cervical cancer. **B. M. C. Cancer.** V.1, n. 2, p. 1471-1479, 2001.

PISANI, P., BRAY, F., PARKIN, D. M. Estimatives of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. **Int J Cancer,** v.97, p. 72-81, 2002.

ROGO KO, NYANSERA PN. Congenital condylomata acuminata with meconium staining of amniotic fluid and fetal hydrocephalus: case report. **East Afr Med J.** v. 66, n. 6, p. 411-3, 1989.

ROUSSEAU, M. C., FRANCO, E. L., VILLA, L. L., SOBRINHO, J. P., TERMINI, L., PRADO, J. M. Accumulative case-control study of risk factor profiles for oncogenic and non-oncogenic cervical human papillomavirus infections. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,** v. 9, p. 469-476, 2000.

SATHISH, N., ABRAHAM, P., PEEDICAYIL, A., SRIDHARAN, G., JOHN, S., SHAJI, R. V., CHANDY, G. HPV DNA in plasma of patients with cervical carcinoma. **J. of Clinical Virology**. v. 31, p. 204-209, 2004.

SCHIFFMAN, M. H.; BAUER, H. M.; HOOVER, R. N.; GLASS, ^a G.; CADELL, D. M.; RUSH, B. B. Epidemiologic evidence showing that papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. **J Natl Cancer Inst**, v. 85, p. 958-964, 1993.

SCHIFFMAN, M. H.; KIVIAT, N. B.; BURK, R. D.; SHAH, K. V.; DANIEL, R. W.; LEWIS, R. Accuracy and interlaboratory reability of human papillomavirus DNA testing using Hybrid Capture. **J Clin Microbiol**, v. 33 p. 5454-550, 1995.

SCHWARZ, E., FREESE, U. K., GISSMANN, L., MAYER, W., ROGGENBUCK, B., ZUR HAUSEN, H. Struture and transcription of human papillomavirus type 18 and 16 sequence in crvical carcinoma cells. **Nature**, v. 314, p. 111-114, 1985.

SCINICARERIELLO, F., SATO, T., LEE, C.S., HSU, H.C., CHAN, T.S., TYRING, S.K. Detection of HPV in primary hepatocellular carcinoma. **Anticancer Res.**, v. 12, n. 3, p. 763-6, 1992.

SEDDLACEK, T. V. Mechanism for human papillomavirus transmission at birth. **Am J Obstet Gynecol**, v. 161, p. 55, 1989.

SEEDORF K, KRAMMER G, DURST M, SUHAI S, ROWEKAMP WG. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. **Virology**. v. 145, n. 1 p. 181-5, 1985.

SHERLAW-JONHSON, C., GALLIVAN, S., JENKINS, D. Evaluating cervical cancer screening programmes for developing coutries. **Int J Cancer**, v. 72, p. 210-216, 1997.

SNIJDERS, P. J. F, van den BRULE, A. J. F., SCHRIJNEMAKERS, H. J. F., SNOW, G., MEIJER, C. J. L. M., WALBOOMERS, J. M. M., The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. **J. Gen. Virol.** v. 71, p. 173-1781, 1990.

STRAUSS, M. J.; SHAW, E. W.; BUNTING, H.; MELNICK, J. L. "Crystalline"virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 72, p. 46-50, 1949.

STOCCO DOS SANTOS, R. C., LINDSEY, C. J., FERRAZ, O. P., PINTO, J. R., MIRANDOLA, R. S., BENESI, F. J., BIRGEL, E. H., BRAGANÇA PEREIRA, C. A., BEÇAK, W. Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations experimental model. **J. Ger. Virology.** v. 79, p. 1-9, 1998.

SUN, X. W., ELLERBROCK, T. V., LUNGU, O., CHIASSEON, M. A., BUSH, T. J., WRIGHT, J. R. Human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-seropositive women. **Obst. Gynecol.** v. 85, p. 680-6, 1995.

THIERRY, F., YANIK, M. The BPV1 E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV-18 regulatory region. **EMBO J**, v. 6, p. 3391-3397, 1987.

TSENG, C.J., LIN, C.Y., WANG, R.L., CHEN, L.J., CHANG, Y.L., HSIEH, T.T. Possible transplacental transmission of HPV. **Am. J. Obstet. Gynecol.** v. 166, p. 35-40, 1992.

TSENG, C. J., LIANG, C. C., SOONG, Y. K., PAO, C. C. Perinatal transmission of human papillomavirus in infants: relationship between infection rate and mode of delivery. **Obstet. Gynecol.** v. 91, n. 1, p. 92-96, 1998.

UNGER, E. R., VERNON, S. D., LEE, D. R., MILLER, D. L., SHARMA, S., CLANCY, K. A., HART, C. E. REEVES, W. C. Human papillomavirus type in anal epithelial lesions is influenced by human immunodeficiency virus. **Arch. Pathol. Lab. Med.** V. 121, p. 820-4, 1997.

VAN DEN BRELE, A. J., SNIJDERS, P. J. F., GORDIN, R. L. J., BLEKER, O. P., MEIJER, C. J. L., WALBOOMERS, J. M. M. General primer-mediated polymerase chain reaction permits the detection of sequenced and still unsequenced human papillomavirus genotypes in cervical scrapes and carcinomas. **Int. J. cancer**, v. 45, p. 644-649, 1990.

VAN DOORNUM, G. J. J., VAN DER HOEK, J. A. R., VAN AMEIJDEN, E. J. C., VAN HAASTRECHT, H. J. A., ROOS, M. T. L., HENQUET, W. G. V., QUINT, W. G. V., COUTINHO, R. A. Cervical HPV infection among HIV infected prostitutes addicted to hard drugs. **J. Med. Virol.** v. 41, p. 185-90, 1993.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M. In: Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Virus. California: Academic Press, 2000.

VILLA, L. L. Human papillomaviruses and cervical. **Adv Cancer Res**, v. 71, p. 321-41, 1997.

WALBOOMERS, J. M.; JACOBS, M. V.; MANOS, M. M.; BOSCH, F. X.; KUMMER, J. A.; SHAH, K. V., Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J. Pathol.** v. 189, p. 12-9, 1999.

WIDSCHWENDTER, A., BLASSNIG, A., WIEDEMAIR, A., HOEZNER, E. M., MULLER, H. M., MARTH, C. Human papillomavirus DNA in sera of cervical cancer patients as tumor marker. **Cancers Letters**, v. 202, p. 231-239, 2003.

WIDSCHWENDTER, A., BRUNHUBER, T., WIEDEMAIR, A., HOLZNER, E. M., MARTH, H. M. Detection of human papillomavirus DNA in breast cancer of patients with cervical cancer history. **J. of Clinical Virology**, v.31, p. 292-297, 2004.

YLIATO, N., SORENSEN, P., JOSEFSSON, A., FRISCH, M., SPAREN, P., PONTEN, J. Smoking and Oral Contraceptives as risk for cervical carcinoma *in situ*. **Int J Cancer**, v. 81, p. 357-365, 1999.

YU Y, MORIMOTO T, SASA M, OKAZAKI K, HARADA Y, FUJIWARA T, IRIE Y, TAKAHASHI E, TANIGAMI A, IZUMI K., HPV33 DNA in premalignant and malignant breast lesions in Chinese and Japanese populations. **Anticancer Res.**, v. 19, n. 6B, p. 5057-61, 1999.

YU Y, MORIMOTO T, SASA M, OKAZAKI K, HARADA Y, FUJIWARA T, IRIE Y, TAKAHASHI E, TANIGAMIA, IZUMI K., Human papillomavirus type 33 DNA in breast cancer in Chinese. **Breast Cancer**, v. .7, n.1, p. 33-6, 2000.

ZHOU J, FRAZER IH., QI YM, PENG SW, HENGST K, EVANDER M, PARK DS, Epithelial cells display separate receptors for papillomavirus VLPs and for soluble L1 capsid protein. **Virology**. v. 216, n. 1, p. 35-45, 1996.

ZUR HAUSEN, H.; MEINHOF, W.; SCHEIBER, W.; BORNKAMM, G. W. Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. **Int J Cancer**, v. 13, p. 650-656, 1974.

ZUR HAUSEN, H. Condylomata acuminata and human genital cancer. **Cancer Res**, v. 36, p. 530, 1976.

ZUR HAUSEN, H. Human papillomavirus in the pathogenesis of anogenital cancer. **Virology**, v.184, p. 9-13, 1991.

ZUR HAUSN, H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1288, p. F55-F78, 1996.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. **J Natl Cancer Inst**, v. 92, p. 690-698, 2000.

ZUR HAUSEN H., Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat. Rev Cancer**. v. 2, n. 5 p. 342-50, 2002.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)