



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

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

LUCIANA PINHEIRO VAZ

**ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Vera Aparecida Saddi
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Flávio Monteiro Ayres**

**GOIÂNIA-GO
2009**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

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

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

LUCIANA PINHEIRO VAZ

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

**ORIENTADORA: Prof^a. Dra. Vera
Aparecida Saddi.**

**GOIÂNIA-GO
2009**

V393d Vaz, Luciana Pinheiro.
Detecção e genotipagem do Papilomavírus Humano
(HPV) em mulheres HIV-positivas e em controles de Goiânia-
GO / Luciana Pinheiro Vaz. – 2009.
105 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Goiás,
2009.

“Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vera Aparecida Saddi”.

“Co-orientador: Prof. Dr. Flávio Monteiro Aires”.

1. HPV – Vírus da Imunodeficiência Adquirida – câncer
do colo uterino. 2. Citologia – reação em cadeia da
polimerase. I. Título.

CDU: 616-006.52(817.3)(043.3)
616.98:578.828HIV



UNIVERSIDADE
Católica
DE GOIÁS

PRÓ-REITORIA DE
PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 • Setor Universitário
Caixa Postal 86 • CEP 74605-010
Goiânia • Goiás • Brasil
Fone: (62) 3946.1071 • Fax: (62) 3946.1073
www.ucg.br • prope@ucg.br

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM GENÉTICA
DEFENDIDA EM 16 DE MARÇO DE 2009 E APROVADA
PELA BANCA EXAMINADORA COM A NOTA**

10 (Dez)

Vera Aparecida Saddi
.....
Dr.^a. Vera Aparecida Saddi / MGene - UCG
(presidente orientadora)

Flávio Monteiro Ayres
.....
Dr. Flávio Monteiro Ayres – MGene – UCG
(co-orientador)

Daniela de Melo e Silva
.....
Dr.^a. Daniela de Melo e Silva – MGene – UCG
(membro interno)

Menira Borges de Lima Dias e Souza
.....
Dr.^a. Menira Borges de Lima Dias e Souza- UFG
(membro externo)

*Dedico esta dissertação aos meus queridos
pais, Manoel e Lúcia, ao meu esposo Mário*

Dedico esta dissertação aos meus queridos pais, Manoel e Sônia, ao meu esposo Mário e aos meus amados filhos Júlia e Victor pelo apoio, incentivo e amor incondicional em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi o resultado de muita dedicação, esforço e colaboração de muitos amigos e colegas.

À Profª Drª Vera Saddi, minha amiga e orientadora, pela credibilidade, incentivo, ensinamentos e generosidade de todos os seus atos na orientação dessa dissertação. Pela mulher extraordinária, extremamente competente, dinâmica e humana, um exemplo a seguir. Por quem eu tenho o privilégio e a graça de Deus de tê-la como verdadeira mestra. Minha admiração e agradecimentos são eternos.

Ao Prof. Dr. Flávio meu amigo e co-orientador pela torcida, incentivo e apoio em todos os momentos. Minha admiração e agradecimento.

Ao Tocha, diretor do CADA, pelo carinho, humildade e atenção com que nos recebeu, permitindo assim a coleta de dados das pacientes, base fundamental desse estudo.

A todas as voluntárias deste estudo, que nos ensinaram muito com os resultados dos exames, mas muito mais com suas histórias de vida.

Ao Prof. Dr. Peixoto pela sua forma de exercer a docência, sempre preocupado em levar cada aluno a produzir o seu melhor, pelo incentivo a todo o momento e admiração pelo profissionalismo, competência e dedicação em tudo que faz. Minha gratidão pela disponibilidade e acolhimento tanto no laboratório quanto na oportunidade como docente no curso de Biologia.

Ao Prof. Cláudio por sua atitude acolhedora e incentivadora, por seu exemplo como professor e pesquisador, sempre comprometido com a integridade.

À Drª Silvia pela amizade, ensinamentos, valiosas sugestões oferecidas e pela generosidade com que se dispusera a realizar os exames de citopatologia.

À Drª Rosane pela seriedade, paciência, dedicação, profissionalismo e por todo auxílio durante a realização da coleta ginecológica das pacientes desse estudo.

À Drª Daniela pelo carinho, amizade, incentivo e torcida.

À Dr^a Mariane pela sua generosidade e auxílio prestados durante a realização dos testes laboratoriais.

Ao Dr. João Serafim pela atenção e auxílio prestados durante a coleta ginecológica das pacientes.

Ao Marcos Milki por ser sempre prestativo e atencioso, pela colaboração e generosidade dos seus atos.

Ao Edésio pela disponibilidade e ajuda na parte estatística deste trabalho.

À Ângela, Carol, Bebê, Eduardo, Priscila, Junelle, Alessandra, Ellen e a todos do Núcleo de Pesquisas Replicon e ao LAGENE pela ajuda incondicional e amizade.

Ao Marcão e Antônio Márcio pela amizade, torcida e ajuda em todos os momentos.

Ao Diego e Willana pela disponibilidade de ajuda a qualquer momento, pela atitude sempre amiga e verdadeira durante toda esta jornada de trabalho.

Ao Dr. Wilmar José Manoel pela amizade verdadeira, pelo carinho, disponibilidade e auxílio sempre presentes.

À Fernanda minha grande amiga, por toda a dedicação, apoio, auxílio, pelo ombro amigo em todos os momentos difíceis dessa travessia e pelo sorriso sempre estimulante de que o amanhã vai ser melhor do que hoje.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Genética da Universidade Católica de Goiás pelos preciosos ensinamentos, pela ajuda e incentivo.

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

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

A Dra. Neusa Soares de Melo pelo apoio, torcida e ensinamentos.

Ao Dr. Nelcivone Soares de Melo e ao Laboratório Atalaia pela generosidade e apoio incondicional para que eu conseguisse realizar esse sonho. Minha admiração e agradecimentos são eternos.

À Eliane e Ediany da SOS Copiadoras pela generosidade e atenção, pelo carinho e disposição presente em todos os momentos, meus agradecimentos.

Às minhas amigas Kênia, Liliane, Sandra, Lenora e Simone pela amizade verdadeira, pela torcida e pelo carinho, sempre presentes.

Às minhas funcionárias Eliene e Lú pelo carinho e dedicação com os meus filhos e minha casa, para que eu me tranqüilizasse na minha rotina de trabalho dessa dissertação.

Ao Dr. Mário, Célia e Carol pelo permanente apoio, torcida e carinho sempre presentes, minha gratidão e amor são eternos.

Aos meus queridos avôs Joaquim, Chiquinha (*in memorian*) e Zulmira (*in memorian*) pelo carinho, amor e torcida de sempre. A saudade é enorme.

Às minhas queridas irmãs Simone e Alessandra pela amizade verdadeira, amor, incentivo e solidariedade. Amo muito vocês.

Aos meus queridos pais Sônia e Manoel pelo amor incondicional, pelos ensinamentos de caráter, honestidade e integridade, pelo apoio ininterrupto durante toda a minha formação acadêmica. Meu amor por vocês é eterno.

Ao Mário pelo permanente apoio, incentivo e companheirismo em todos os momentos. Pela oportunidade de ter uma família linda e estruturada. Amo você.

Aos meus lindos e maravilhosos filhos Júlia e Victor, diamantes raros, que eu agradeço a Deus todos os dias da minha vida por ter me presenteado. Perdoem-me pela ausência física em muitos momentos, mas meu coração e pensamento estão sempre em vocês. Amo vocês incondicionalmente.

Às pessoas que indiretamente me deram suporte para a realização deste trabalho e a todos aqueles cujos nomes deixo de citar, mas que ao lerem estas palavras incorporarão meus sinceros agradecimentos.

Por fim, agradeço a Deus pela saúde e pelo desejo de realizar mais um sonho em minha vida e por ter verdadeiros amigos e uma família, base da minha vida.

RESUMO

A infecção genital pelo Papilomavírus Humano (HPV) é considerada a doença sexualmente transmissível mais frequente em todo o mundo, representando importante problema de saúde pública devido à sua estreita associação com o câncer cervical. Estima-se que 75% da população sexualmente ativa entre em contato com um ou mais tipos de HPV durante a vida e uma prevalência bastante elevada é observada em mulheres jovens. Estudos epidemiológicos mostram que mulheres infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) apresentam maior prevalência de infecção pelo HPV e maior associação com múltiplos genótipos de HPV, comparadas às mulheres HIV-negativas. O objetivo deste trabalho foi comparar a prevalência das infecções pelo HPV e seus possíveis fatores de risco entre mulheres HIV-positivas e HIV-negativas, na cidade de Goiânia-GO. A detecção do genoma viral utilizou a reação em cadeia da polimerase (PCR), com *primers* genéricos GP5+/GP6+ e *primers* específicos para a genotipagem do HPV-16 e HPV-18. O estudo envolveu uma população de 60 mulheres soropositivas para o HIV, assistidas pelo CADA (Centro de Apoio ao Doente com AIDS) e 60 mulheres soronegativas selecionadas durante a Semana de Cultura e Cidadania da Universidade Católica de Goiás em junho de 2007. Todas as pacientes foram informadas sobre o estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. A estatística descritiva com suas respectivas frequências foi realizada para as variáveis relativas às características sócio-demográficas, comportamentais e clínico-patológicas das amostras obtidas. O teste do *qui-quadrado* com correção de Yates foi usado para avaliar as possíveis diferenças entre os aspectos sócio-demográficos, comportamentais e clínico-patológicos, no grupo de mulheres HIV-positivas e HIV-negativas. Para investigar as possíveis associações entre os fatores selecionados e a infecção por HPV realizou-se análise univariada, pelo teste do *qui-quadrado* com correção de Yates. Os dois grupos se mostraram semelhantes com relação às características sócio-demográficas e comportamentais, porém, diferenças significativas foram observadas entre o estado civil, a renda familiar, a escolaridade, o número de parceiros sexuais, a história de prostituição e o tabagismo. A prevalência de infecção pelo HPV foi de 64,3% nas mulheres HIV-positivas e de 35,7% nas mulheres HIV-negativas. O HPV-16 foi o tipo mais prevalente em ambos os grupos, correspondendo a 67,5% das HIV-positivas e 32,5% das HIV-negativas ($p < 0,05$) [OR = 2,5; IC 95% (1,148-5,531)]. Dentre as mulheres que apresentaram NIC I, todas eram HIV-positivas e dentre as que apresentaram NIC II/NICIII, 85,7% eram HIV-positivas comparadas a 14,3% nas mulheres HIV-negativas. A combinação entre os genótipos do HPV-16 e do HPV-18 esteve presente em 72,2% das mulheres HIV-positivas, e em 27,8% das mulheres HIV-negativas. Nosso estudo demonstrou uma maior prevalência da infecção pelo HPV nas mulheres infectadas pelo HIV. O HPV-16 foi o genótipo viral mais comum em ambos os grupos, entretanto, infecções concomitantes com o HPV-16 e HPV-18 foram significativamente mais prevalentes nas mulheres infectadas pelo HIV. Nossos resultados permitem inferir que a infecção pelo HIV representa um fator de risco significativo para a infecção pelo HPV.

Palavras-chave: HPV; Virus da Imunodeficiência adquirida; Reação em cadeia da polimerase; Citologia, Câncer do colo uterino.

ABSTRACT

Genital infection with the human papillomavirus (HPV) is considered to be the most frequent sexually transmitted disease in the world, representing an important public health problem due to its close association with cervical cancer. It is estimated that 75% of the sexually active population comes into contact with one or more types of HPV during their lifetime, resulting in a considerably high prevalence of the virus in young women. Epidemiological studies shows that women infected by the human immunodeficiency virus (HIV) presents a higher prevalence of infection by HPV and a greater association with multiple genotypes of HPV compared those who are HIV negative. The objective of this study was to compare the prevalence of HPV infections and its possible risk factors in a group of HIV positive and HIV negative women, in the city of Goiania – GO. Polymerase chain reaction, using generic primers GP5+/GP6+, was carried out to detect the viral genome and specific primers were used for HPV-16 and HPV-18 genotyping. The study included a population of 60 HIV seropositive women, assisted by CADA (Centro de Apoio ao Doente com AIDS), and 60 HIV seronegative women selected in June, 2007, during a Public Health Program conducted by the Universidade Católica de Goiás. All the patients were informed about the study and signed an informed consent. Both groups were similar concerning social demographics and behavioral characteristics, however, significant differences were observed among their marital status, household income, educational status, number of sexual partners, prostitution history and tobacco smoking. The prevalence of HPV infection was 64.3% among women who were HIV positive and 32.5% among those who were HIV negative. HPV-16 was the most prevalent type in both groups, with a prevalence of 67.5% in HIV positive women and 32.5% in HIV negative women. Among the women who presented CIN I, all were HIV positive and in those who presented CIN II/CIN III, 85.7% were HIV positive. The combination between HPV-16 and HPV-18 genotypes was present in 72.2% of the HIV positive women, and in 27.8% of the HIV negative women. Our study demonstrated a greater HPV infection prevalence in those women infected with HIV compared to those who were HIV negative. HPV-16 was the most commonly found genotype in both groups, however, dual infections with HPV-16 and HPV-18 were significantly more prevalent in those women infected with HIV. Our results allowed us to conclude that infection with HIV represents a significant risk factor for the HPV infection.

Key-words: HPV; Acquired Immunodeficiency Virus; Polymerase Chain Reaction; Cytology; Cervix Cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Taxas de infecção pelo HPV associadas à idade, em diferentes condições fisiopatológicas	22
Figura 2 – Representação espacial dos coeficientes de incidência estimados para o câncer do colo do útero, em mulheres, por Unidade da Federação, 2008	31
Figura 3 – Árvore filogenética do papilomavírus.....	39
Figura 4 – Estrutura representativa do genoma do HPV-16.....	40
Figura 5 – Ação da proteína p53 sobre o ciclo celular.....	41
Figura 6 – Ação da proteína pRb sobre o ciclo celular	42
Figura 7 – O ciclo reprodutivo do HPV	45
Figura 8 – O desenvolvimento do câncer cervical após a infecção primária	46
Figura 9 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, corado nitrato de prata, mostrando os produtos de PCR obtidos com a utilização de <i>primers</i> específicos para o gene GAPDH	63
Figura 10 – Amplificação por PCR da região L1 do genoma do HPV, utilizando os <i>primers</i> genéricos GP5+/GP6+	68
Figura 11 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata, mostrando fragmentos com cerca de 120 pares de bases obtidos por ensaios de PCR com a utilização de <i>primers</i> específicos para a região E6 do HPV-16.....	70

Figura 12 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, corado com Nitrato de Prata, mostrando fragmentos com cerca de 175 pares de bases, obtidos por ensaios de PCR com a utilização de primers específicos para a região E6 do HPV-18.....70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos HPVs quanto ao tropismo e categoria de risco para o desenvolvimento de neoplasias	38
Tabela 2 – Descrição dos <i>primers</i> e protocolos de ciclagem usados no ensaio de PCR para a amplificação do gene GAPDH em amostras cervicais.....	60
Tabela 3 – Descrição dos <i>primers</i> , tamanho dos amplicons e protocolos de ciclagem usados no ensaio de PCR para detecção de HPV e genotipagem do HPV-16 e HPV-18, em amostras cervicais.....	61
Tabela 4- Análise descritiva das características sócio-demográficas e comportamentais do grupo estudado	64
Tabela 5 – Análise descritiva das características clínico-patológicas das amostras cervicais estudadas.....	65
Tabela 6 – Análise univariada das características sócio-demográficas e comportamentais avaliadas para os dois grupos estudados.....	67
Tabela 7 – Análise univariada segundo as características clínico-patológicas dos grupos estudados.....	69
Tabela 8 – Detecção de HPV em relação às características clínico-patológicas e comportamentais em pacientes HIV negativas	71
Tabela 9 - Detecção de HPV em relação às características clínico-patológicas e comportamentais em pacientes HIV positivas.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida

ASCUS – Alterações em células escamosas de significado indeterminado

CADA – Centro de Apoio ao Doente com AIDS

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DST – Doença sexualmente transmissível

HAART – Terapia anti-retroviral altamente ativa

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HSIL – do inglês: *low grade squamous inthraepithelial lesion*

HPV – Papilomavírus humano

INCA – Instituto Nacional do Câncer

LAS – Laboratório da Área da Saúde

LCR – do inglês: *Long control region*

LSIL – do inglês: *high grade squamous inthraepithelial lesion*

LTR – do inglês: *Long terminal repeat*

MS – Ministério da Saúde

NCR – do inglês: *Non-coding region*

NIC – Neoplasia intra-epitelial cervical

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RNA – Ácido ribonucléico

SIL – Lesão intra-epitelial escamosa

URR – do inglês: *Upstream regulatory region*

VLP – do inglês: *Virus like particles*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Epidemiologia da infecção pelo HPV na população feminina em geral....	24
1.2 Epidemiologia da infecção pelo HPV na população feminina soropositiva para o HIV	22
1.3 Doença cervical uterina na população feminina em geral	28
1.4 Doença cervical uterina na população feminina soropositiva para o HIV	35
1.5 Papilomavírus humano.....	37
1.5.1 Características	37
1.5.2 Classificação.....	37
1.5.3 Genes virais	38
1.5.4 Ciclo de vida	43
1.5.5 Transformação celular	45
1.5.6 Patogênese.....	47
1.5.7 Vacina.....	47
1.6 Mecanismo de potencialização da patogênese associada ao HPV em mulheres soropositivas para o HIV.....	49
2 JUSTIFICATIVAS.....	53
3 OBJETIVOS	54
3.1 Objetivo geral	54
3.2 Objetivos específicos.....	54
4 METODOLOGIA.....	55
4.1 Desenho do estudo	55
4.2 Encaminhamento e aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa.....	55
4.3 Seleção de sujeitos	55
4.4 Coleta de espécimes cervico-vaginais	56
4.5 Diagnósticos moleculares.....	56
4.5.1 Extração de DNA	57
4.5.1.1 Preparo das amostras	57
4.5.1.2 Lise celular	57

4.5.1.3 Tratamento com RNase	58
4.5.1.4 Precipitação de proteína	58
4.5.1.5 Precipitação do DNA	58
4.5.1.6 Hidratação do DNA	59
4.5.2 Amplificação do gene GAPDH, usado como controle da qualidade do DNA purificado.....	59
4.5.3 Detecção do genoma viral utilizando os primers genéricos GP5+/GP6+ e genotipagem do HPV-16 e HPV-18 utilizando primers tipo-específicos.....	60
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
6 RESULTADOS	63
6.1 Caracterização da amostra	63
6.2 Diferenças entre as características sócio-demográficas e comportamentais dos dois grupos estudados	65
6.3 Características clínico-patológicas dos grupos estudados.....	67
6.4 Associações entre a detecção do genoma do HPV e as características clínico-patológicas e comportamentais das mulheres estudadas.....	70
7 DISCUSSÃO	74
8 CONCLUSÕES	86
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

O câncer cervical e suas lesões precursoras são as manifestações ginecológicas mais importantes em mulheres infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Mbulaiteye *et al.*, 2003). Mulheres infectadas pelo HIV têm cinco vezes mais chance de apresentar lesões intraepiteliais cervicais do que mulheres não infectadas (Ellerbrock *et al.*, 2000), assim como o câncer cervical (Mellin *et al.*, 2000). A alta prevalência de lesões intraepiteliais cervicais (SIL) associadas ao HPV em mulheres infectadas pelo HIV, sugere que a resposta imune do hospedeiro desempenha um papel importante no desenvolvimento do câncer cervical associado ao HPV. A infecção pelo HPV é um importante fator de risco para o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do colo uterino, com maior chance de desenvolvimento em portadoras do HIV, em decorrência da imunossupressão. Ainda não está bem esclarecido como a imunossupressão induzida pelo HIV contribui para a susceptibilidade à infecção pelo HPV e ao desenvolvimento da doença cervical. Contudo, muitos autores acreditam que a função linfocitária diminuída resulta em um aumento da atividade do HPV na infecção latente ou sub-clínica, resultando provavelmente em maior persistência da infecção (Brain, 1994; Sun *et al.*, 1997; Moscicki *et al.*, 2000; Palefsky, 2006).

O alto risco para a infecção persistente pelo HPV e neoplasia cervical em mulheres HIV-positivas parece decorrer da interação entre os dois vírus, determinando a diminuição da imunidade local por redução das células de Langerhans e da produção de citocinas (Sun *et al.*, 1997; Ahdieh *et al.*, 2001; Rowhani-Rahbar *et al.*, 2007). A inabilidade em controlar a expressão e a replicação do HPV, pelo comprometimento do sistema imune, contribui significativamente para o desenvolvimento do câncer cervical e suas lesões precursoras. Vários aspectos fundamentais da associação HIV-HPV, como o estado imunológico, caracterizado pelos níveis de RNA do HIV, contagem de células TCD4+ e a história natural do HPV estão relacionados com o desenvolvimento do câncer cervical e suas lesões precursoras (Strickler *et al.*, 2005). Entretanto, alguns estudos não encontraram correlação entre LSILs (lesão

intraepitelial escamosa de baixo grau) ou o DNA do HPV e a contagem de células TCD4+ (Vernon *et al.*, 1994). Essas diferenças podem ser atribuídas aos diferentes estágios da história natural do HPV ou da infecção pelo HIV nas várias populações estudadas (Moscicki *et al.*, 2000).

Mulheres infectadas pelo HIV com ou sem anormalidades citológicas são infectadas com múltiplos tipos de HPV comparadas às mulheres HIV negativas (Tornesello *et al.*, 2008). Em recente metanálise mundial incluindo 5578 mulheres HIV positivas, Clifford *et al.* (2006) verificaram que o HPV-16 estava presente em uma menor proporção de infecções pelo HPV, assim como em lesões intraepiteliais de alto grau, comparados à população feminina em geral. No mesmo estudo, outros tipos de HPV de alto risco (18,51,52 58) e de baixo risco (11,53,61) foram frequentemente encontrados em mulheres HIV-positivas com lesões intraepiteliais cervicais de alto grau. A infecção pelo HIV pode levar ao aumento da oncogenicidade tanto do HPV de alto risco e assim como dos tipos de baixo risco. Entretanto, não está totalmente claro se as infecções por tipos de HPV, que raramente progridem para lesões severas em mulheres imunocompetentes, possam causar lesões de alto grau e câncer invasivo em mulheres HIV-positivas (Tornesello *et al.*, 2008). Esta questão é particularmente relevante, em relação à prevenção do câncer cervical nas populações de alto risco, devido ao fato de que os métodos usualmente utilizados para detectar o DNA do HPV, podem não detectar todos os tipos de HPV (Poljak *et al.*, 2002; Tornesello *et al.*, 2008).

Mulheres HIV positivas apresentam alta prevalência de DNA do HPV (Sun *et al.*, 1995; Palefsky *et al.*, 1999; Moscicki *et al.*, 2000; Ahdieh *et al.*, 2001; Jamieson *et al.*, 2002; Strickler *et al.*, 2003), de câncer cervical (Bosch *et al.*, 1995; Munoz *et al.*, 2003) e de LSILs (Massad *et al.*, 1999; Ahdieh *et al.*, 2001; Ellerbrock *et al.*, 2000; Duerr *et al.*, 2001; Massad *et al.*, 2001; Schuman *et al.*, 2003). As lesões precursoras causadas pelo HPV em mulheres HIV positivas apresentam menor taxa de regressão, maiores períodos de persistência e progressão mais rápida; são mais refratárias ao tratamento e mais recorrentes, necessitando assim de maior monitoração e intervenção mais agressiva para evitar a evolução para o carcinoma invasor (Sun *et al.*, 1997; Ahdieh *et al.*, 2001; Rowhani-Rahbar *et al.*, 2007).

1.1 Epidemiologia da infecção pelo HPV na população feminina em geral

Estudos epidemiológicos revelam que a infecção genital, causada pelo papilomavírus humano (HPV) é um problema de importância crescente, devido à sua elevada frequência, sua associação com o câncer e outras implicações clínicas e pessoais (Baseman & Koutsky, 2005; Trottier & Franco, 2006). A infecção pelo HPV é considerada a doença sexualmente transmissível (DST) mais freqüente em todo o mundo, cuja prevalência varia entre 2% a 68%, de acordo com os relatos da literatura. Essa variação é decorrente do tipo de população estudada e do emprego de diferentes métodos de diagnóstico nos vários estudos (Franco, 1995; Burk *et al.*, 1996; Castellsagué *et al.*, 1997; Baseman e Koutsky, 2005).

Estima-se que 75% da população sexualmente ativa entre em contato com um ou mais tipos de HPV durante sua vida, sendo que a metade dos novos casos acontece nos primeiros anos de atividade sexual (Koutsky, 1997; Weaver, 2006; Wiley & Masongsong, 2006). Estudos relatam que grande parte da população adulta sexualmente ativa apresenta infecção pelo HPV, embora apenas 1% apresenta o condiloma clássico e 2% apresenta lesões visíveis, somente após a aplicação do ácido acético (Gollnick *et al.*, 2001). Estimativas atuais sugerem que 20 milhões de norte-americanos estejam infectados pelo HPV e mais de 5 milhões de infecções ocorram a cada ano (Cox, 2006). A infecção pelo HPV é mais comum em indivíduos jovens e sexualmente ativos, apresentando dois picos de prevalência: um mais elevado em mulheres jovens, com queda gradual com a idade, e outro entre a quarta e quinta décadas de vida. Esse segundo pico reflete a perda da imunidade original contra o vírus, ao qual esteve exposta em idade mais jovem (Franco & Harper, 2005).

As infecções pelo HPV são usualmente transientes e não necessariamente levam a lesões clinicamente significativas da mucosa cervical. Entretanto, dados epidemiológicos e laboratoriais sustentam a conclusão de que o HPV é o agente etiológico mais importante das lesões epiteliais pré-malignas e malignas da mucosa cervical, sendo o DNA do HPV detectado em 95% a 100% de todos os casos (de Francesco *et al.*, 2005). Diante da alta incidência de infecção pelo HPV comparada com baixa prevalência de câncer cervical, outros fatores

provavelmente estão envolvidos na transformação maligna da mucosa cervical. Esses cofatores podem incluir o fumo, uso de contraceptivo oral, paridade, infecção associada a outras doenças sexualmente transmissíveis e outros fatores (Munoz *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2002; Plummer *et al.*, 2003; MycIntyre-Seltman *et al.*, 2005; Castellsague *et al.*, 2006).

A infecção pelo HPV é geralmente transitória e auto-limitada. Estudos revelam que até 90% das infecções pelo HPV são eliminadas ou suprimidas em níveis indetectáveis após 12 a 24 meses (HO *et al.*, 1998; Franco *et al.*, 1999). Apesar disso, uma tendência de aumento da prevalência é observada em decorrência do acúmulo de casos de infecção, devido a uma das características peculiares do HPV, que consiste na impossibilidade de remoção total do vírus do epitélio infectado, mediante intervenções médicas (Ward *et al.*, 1994; Lassus *et al.*, 1994), e por se tratar de uma infecção do epitélio, muitas vezes, multicêntrica e com poucos sintomas ou assintomática (Gross *et al.*, 1997). Infecções com os HPVs de alto risco, principalmente o HPV-16 e o HPV-18, parecem ter persistência maior do que aquelas associadas aos HPVs de baixo risco (Reidi, 1993; Wieland & Pfister, 1999; Richardson *et al.*, 2003; Lang *et al.*, 2005).

A prevalência do DNA do HPV na cérvix uterina de mulheres com citologia normal tem sido estimada em várias regiões do mundo, utilizando métodos sensíveis de detecção. A prevalência é mais alta no continente africano com 23%, 15,6% nas Américas, 8,3% na Ásia e 6,6% na Europa (WHO, 2008). As estimativas de prevalência comumente variam em função da idade da população, da infecção pelo HIV e do comportamento sexual. A prevalência do HPV está relacionada à idade na maioria das populações estudadas, sendo que mulheres entre 15 e 25 anos de idade apresentam taxas mais elevadas, correspondendo a 25%-40% dos casos (de Sanjosé *et al.*, 2007; Hoory *et al.*, 2008). A Figura 1 mostra as taxas de incidência da infecção pelo HPV associadas às anormalidades na mucosa cervical, entre grupos com idades diferentes.

A incidência cumulativa de infecção pelo HPV no trato genital de mulheres com idade menor que 25 anos é estimada em 50%, dentro de 3 anos do início da relação sexual, e o risco cumulativo é estimado em 75% ou mais (Ho *et al.*, 1998; Cates, 1999; Baseman & Koutsky, 2005). As taxas de prevalência do HPV associadas à idade em diferentes populações são variadas (Franceschi *et al.*,

2006; de Sanjosé *et al.*, 2007). O aumento na prevalência do HPV em idade acima dos 40 anos reflete uma mudança geral no comportamento sexual, resultando em novas exposições ou reativação de uma infecção pelo HPV latente, adquirida em idade mais jovem. Um estudo que analisou a incidência de HPV associada à idade, encontrou uma incidência mais alta de HPV em mulheres acima dos 40 anos de idade e este aumento está associado com novos parceiros sexuais (Munoz *et al.*, 2004).

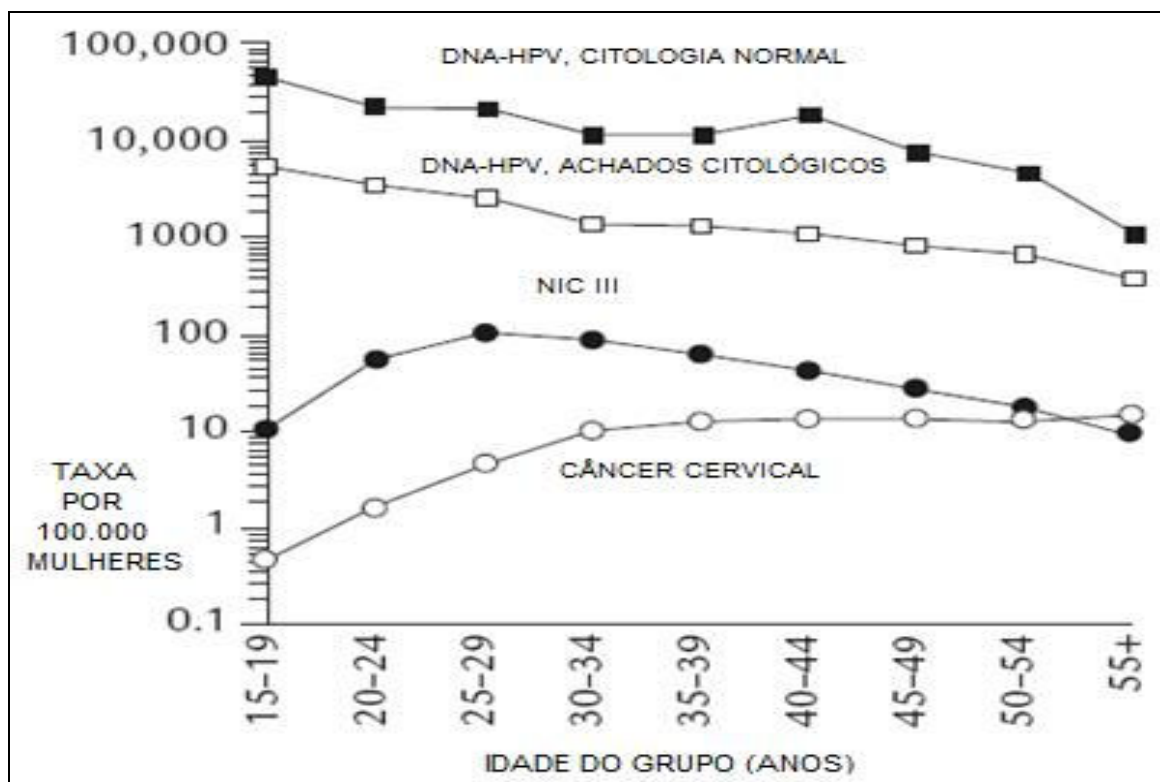


Figura 1 – Taxas de infecção pelo HPV associadas à idade, em diferentes condições fisiopatológicas. A prevalência de infecções assintomáticas pelo HPV é significativamente maior que a prevalência de lesões intraepiteliais cervicais e de câncer cervical (Modificado de Schiffman, 1994).

A prevalência da infecção pelo HPV varia dependendo da técnica de detecção utilizada e da população avaliada. O exame de Papanicolaou é o método mais efetivo de triagem na prevenção do câncer cervical e resultou em uma diminuição considerável da incidência de câncer cervical e na mortalidade em muitos países. Apesar do sucesso dos programas de triagem para o câncer cervical, baseados na citologia convencional de Papanicolaou, a estimativa real da sensibilidade desse exame é de 50% a 60% (Fahey *et al.*, 1995; Nanda *et al.*, 2000; Bastian *et al.*, 2003). O exame convencional apresenta especificidade ainda limitada em relação às lesões clinicamente significantes, como as anormalidades citológicas de baixo grau, e pode apresentar resultados falsos negativos (Dehn *et al.*, 2007). Com o advento das técnicas de biologia molecular, foi possível obter estimativas mais fidedignas, já que a maioria da população infectada pelo HPV não apresenta sintomas clínicos ou alterações citológicas. Mais recentemente, com o desenvolvimento da técnica de PCR, descobriu-se que as infecções pelo HPV podem ser muito mais comuns, atingindo desde portadoras assintomáticas até pacientes com câncer cervical invasivo. Em um recente estudo, a sensibilidade de detecção do DNA do HPV, utilizando a técnica de PCR e os *primers* GP5+ e GP6+, foi de 92% e a especificidade de 89,9% a 100%, em lesões de alto grau (Dehn *et al.*, 2007).

Apesar das estimativas serem variáveis, é indiscutível que a incidência da infecção pelo HPV seja alta, principalmente após a primeira relação sexual e a cada introdução de novo parceiro sexual. Estudos de coorte, utilizando a técnica de PCR para detecção do vírus, demonstraram que aproximadamente 3% das mulheres previamente negativas tornam-se positivas em um teste subsequente. A incidência dos tipos oncogênicos é frequentemente maior comparada aos tipos não-oncogênicos (Trottier & Franco, 2006). Em estudos de coorte, cujas amostras eram formadas por estudantes, a incidência cumulativa ultrapassou 40% em três anos de acompanhamento (Ho *et al.*, 1998; Woodman *et al.*, 2001; Winer *et al.*, 2003). Em coorte brasileira, a incidência cumulativa foi de 24% em 18 meses (Franco *et al.*, 1999).

Uma metanálise recente avaliou 78 estudos com mulheres apresentando citologia normal e encontrou uma prevalência global estimada de 10,4% para a infecção pelo HPV (de Sanjosé *et al.*, 2007). Este mesmo estudo

indicou que a prevalência é maior nas mulheres mais jovens, nos primeiros anos de atividade sexual e decresce com o aumento da idade, dado mostrado previamente em outros estudos (Schiffman, 1992; Kjaer *et al.*, 2000). Outro padrão da prevalência da infecção pelo HPV tem sido descrito com um segundo pico em mulheres no climatério (Herrero *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2004). As razões para esse segundo pico e sua variação geográfica não foram ainda estabelecidas. A prevalência da infecção pelo HPV apresenta heterogeneidade significativa em sua distribuição geográfica. Um estudo multicêntrico encontrou prevalências estimadas ajustadas para a idade que variam de 5% em populações mediterrâneas e até mais de 15% em diversos países da América Latina (Clifford *et al.*, 2005).

A literatura brasileira carece de estatísticas nacionais. Um estudo transversal com mulheres atendidas em um serviço público de rastreamento para câncer em Porto Alegre (RS) detectou o material genético do HPV (HPV-DNA) em 27% das amostras (Nonnenmacher *et al.*, 2002). Oliveira *et al.* (2006) identificaram positividade para o HPV em 58% das mulheres encaminhadas para exame de rotina em serviço privado do Rio de Janeiro, RJ. Em estudo realizado na população rural do Nordeste brasileiro, sobre doenças sexualmente transmissíveis, a prevalência de HPV foi de 26% (de Lima *et al.*, 2003).

1.2 Epidemiologia da infecção pelo HPV na população feminina soropositiva para o HIV

A epidemia da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e da AIDS constitui fenômeno mundial, dinâmico e instável. Hoje, após mais de 20 anos de sua identificação, pode ser considerada a maior pandemia do século XX, com cerca de 46 milhões de pessoas infectadas no mundo. Deste contingente de infectados, 50% são mulheres. Esse número é 50% superior à projeção feita em 1991 pelo Programa Mundial contra a AIDS, da Organização Mundial de Saúde (OMS), para o final da última década do século passado (Lewi *et al.*, 2003). No Brasil, desde a identificação do primeiro caso de AIDS, em 1980, já foram identificados cerca de 600.000 casos da doença. O país acumulou cerca de 183.000 óbitos até 2005, sendo as taxas de mortalidade crescentes até meados

da década de 1990, estabilizando-se em cerca de 11.000 óbitos anuais desde 1998 (Ministério da Saúde, 2006).

O aumento da transmissão por contato heterossexual determinou o crescimento substancial dos casos na população feminina, o que tem sido considerado como uma das mais importantes características do atual quadro da epidemia no Brasil e em todo o mundo (Hader *et al.*, 2001). O crescimento da incidência de doenças sexualmente transmissíveis (DST), sobretudo em mulheres jovens, conferiu ao Brasil o mais rápido aumento de casos de AIDS na população feminina descrito no mundo. Dentre as DSTs, a infecção pelo HIV tornou-se a mais prevalente (Lopes *et al.*, 2001). Pelo menos 50% das infecções pelo HIV acometem mulheres, e em alguns países africanos a proporção de mulheres atingidas é de 60% em relação aos homens. A infecção pelo HIV entre as mulheres incide principalmente na população sexualmente ativa, o que estabelece margem para a co-infecção pelo HPV (Lyons *et al.*, 2003).

A coinfeção HIV e HPV é um fenômeno completamente previsível, tendo em vista que os fatores de risco para essas duas infecções são bastante similares. Múltiplos parceiros sexuais, idade precoce para a primeira relação sexual, sexo com homens que tiveram múltiplas parceiras, baixo nível sócio-econômico, prática sexual sem proteção são importantes fatores de risco comuns às duas infecções virais. Vários estudos na literatura referenciam a forte associação existente entre a oncogênese e a progressão neoplásica relacionada ao HPV e ao sistema imunológico (Nicol *et al.*, 2005). Mulheres imunossuprimidas apresentam risco elevado de desenvolvimento de neoplasia intra-epitelial escamosa e câncer invasivo do trato genital inferior (Pinto *et al.*, 2002).

A presença de altas prevalências da infecção pelo HPV em mulheres portadoras do HIV já foi documentada na literatura, com estimativas que variam entre 49,5% (Heard *et al.*, 2000), 54% (Ellerbrock *et al.*, 2000) a 100% (Levi *et al.*, 2002; Queiroz *et al.*, 2004), dependendo do método de diagnóstico. Heard *et al.* (2000), analisando 307 mulheres HIV-positivas, detectaram o DNA do HPV em 49,5% dos casos, usando a técnica de PCR, sendo que 24,8% dessas mulheres apresentaram-se com ASCUS e 27% com NIC (13,7% com LSIL e 13,3% com HSIL). Um estudo, utilizando o método de PCR para detecção do DNA viral, foi conduzido em mulheres HIV-positivas e HIV-negativas (Moscicki *et al.*, 2000).

Este estudo demonstrou a presença do genoma do HPV em 77,4% das mulheres HIV-positivas, comparadas a 54,5% das mulheres HIV-negativas. O mesmo estudo revelou que 61,7% das mulheres HIV-positivas, que apresentavam achados citológicos normais, apresentavam o DNA do HPV nas amostras cervicais. Por outro lado, somente 29,9% das mulheres HIV-negativas com achados citológicos normais apresentavam o DNA do HPV nas células cervicais. O DNA do HPV foi detectado em 90,9% de mulheres infectadas pelo HIV, que apresentaram SILs. Cerca de 90% das mulheres HIV-positivas com ASCUS também foram positivas para o DNA do HPV, comparadas a 42,9% das mulheres HIV-negativas.

Altas prevalências de SILs estão associadas com a infecção pelo HPV em mulheres HIV-positivas. Em um recente estudo, em que foram analisadas 328 mulheres infectadas pelo HIV e 325 mulheres não infectadas, o DNA do HPV foi detectado em 54% dos casos HIV-positivos comparados a 32% das mulheres HIV-negativas, utilizando a técnica de PCR. Dentre as mulheres infectadas pelo HIV, 20% apresentaram SIL, sendo que 91% das lesões correspondiam a lesões intraepiteliais de baixo grau e 9% a lesões de alto grau. Entretanto, dentre as mulheres HIV-negativas, apenas 5% apresentaram SIL, sendo 75% com lesões intraepiteliais de baixo grau e 25% com lesões de alto grau. O estudo demonstrou que mulheres infectadas pelo HIV apresentam um risco 4,5 vezes maior de desenvolver lesões intraepiteliais (Ellerbrock *et al.*, 2000).

Um estudo como o *Women's Interagency HIV Study* (WIHS), que analisou 2.015 mulheres HIV positivas e 577 controles negativos pareados, demonstrou prevalência de 58% de mulheres co-infectadas, comparadas com 26% de mulheres HPV-positivas entre as soronegativas para o HIV. Paralelamente, dados advindos dessa pesquisa revelaram que nas pacientes soropositivas para o HIV observa-se aumento da prevalência da infecção pelo HPV quando a imunodeficiência é mais severa, bem como maior prevalência dos tipos 16 e 18, de maior poder oncogênico (Lyons *et al.*, 2003). Dois grandes estudos de coorte identificaram altas taxas de prevalência da infecção pelo HPV nas mulheres positivas para o HIV. Tanto os tipos oncogênicos, quanto os não oncogênicos foram significativamente mais comuns entre as mulheres infectadas com o HIV (Palefsky *et al.*, 1999; Jamieson *et al.*, 2002).

Estudos brasileiros também descreveram a alta prevalência do HPV em mulheres soropositivas para o HIV. Levi *et al.* (2002) analisando mulheres infectadas pelo HIV, encontrou uma prevalência do DNA do HPV em 64,5% dessas mulheres, sendo que em 19% foram observadas anormalidades citológicas compatíveis com NIC (12% NICI, 5% NICII e 2% NIC III). Em outro estudo, Levi *et al.* (2004), analisando 208 mulheres infectadas pelo HIV, verificaram por análise de PCR, que virtualmente todas as mulheres eram positivas para o HPV (98%), com 80% delas infectadas por múltiplos genótipos de HPV (média de 3,1 genótipos por paciente) e 90% apresentando citologia inflamatória.

Estudos prospectivos sugerem que metade das infecções por HPV em mulheres HIV-positivas é adquirida sexualmente em um período recente, enquanto a outra metade representa reativação de infecções previamente adquiridas (Strickler *et al.*, 2005). Alguns autores afirmam que mulheres infectadas por HIV têm uma maior prevalência de HPV, com múltiplos genótipos de HPV e de subtipos oncogênicos, comparadas às mulheres não infectadas pelo HIV (Moscicki *et al.*, 2000; Ellerbrock *et al.*, 2000; Strickler *et al.*, 2003).

Estudos demonstram que a detecção do DNA do HPV está associada com níveis mais baixos de linfócitos T CD4+ e cargas virais mais elevadas do HIV. O tipo viral menos afetado pela contagem diminuída de células T CD4+ foi o HPV 16. Níveis mais baixos de linfócitos T CD4+, principalmente abaixo de 200 células/mm³, associaram-se à detecção de múltiplos tipos de HPV (Palefsky *et al.*, 1999; Strickler *et al.*, 2003; Strickler *et al.*, 2005). Além de maior incidência, a persistência da infecção é significativamente maior entre as pacientes HIV positivas, quando comparadas com mulheres não infectadas pelo HIV (Frisch *et al.*, 2000; Lefevre *et al.*, 2004). Em mulheres portadoras do HIV, a prevalência e a persistência da infecção aumentam com a queda da contagem de linfócitos T CD4+ e a elevação da carga viral, sendo que alguns estudos mostram que tipos oncogênicos do HPV podem ser mais comuns, com baixas contagens de CD4+ e/ou carga viral mais alta (Minkoff *et al.*, 1998; Palefsky *et al.*, 1999; Luque *et al.*, 1999).

De acordo com Sun *et al.* (1997), a infecção persistente pelo HPV foi significativamente mais comum nas mulheres portadoras do HIV, quando

comparadas às HIV-negativas. Resultados semelhantes foram descritos por Rachid e Schechter (2005). Esses autores relataram que a prevalência da infecção pelo HPV aumenta à medida que ocorre progressão do dano imunológico associado à infecção pelo HIV. A prevalência e a incidência das lesões intra-epiteliais cervicais também são maiores nas pacientes portadoras do HIV do que naquelas HIV-negativas (Palefsky, 2003). Mulheres infectadas pelo HIV têm menores taxas de regressão de lesões intra-epiteliais de baixo grau e apresentam maior risco de progressão para lesões intra-epiteliais de alto grau, principalmente quando apresentam baixa contagem de linfócitos CD4+ (Palefsky *et al.*, 1999; Duerr *et al.*, 2006).

Com o advento da terapia anti-retroviral altamente ativa (HAART), cresceu a expectativa de mudanças na história natural da infecção pelo HPV, assim como o número de doenças induzidas pelo vírus nas mulheres portadoras do HIV. Entretanto, tais modificações não têm sido frequentemente demonstradas pela literatura atual. Nenhum estudo mostrou o efeito da HAART na presença e persistência da infecção cervical pelo HPV, mesmo naquelas mulheres que apresentaram aumento dos níveis de células T CD4+. Em relação aos efeitos da HAART na história natural das lesões intra-epiteliais, os dados permanecem inconsistentes e controversos (Kojic & Cu-uvin, 2007).

1.3 Doença cervical uterina na população feminina em geral

O carcinoma de células escamosas do colo uterino é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres mundialmente, com aproximadamente 500.000 casos novos por ano e responsável pela morte de metade deste número anualmente. O câncer cervical representa a segunda causa de morte por câncer em mulheres no mundo e a primeira em países em desenvolvimento (Parkin *et al.*, 2005; WHO, 2006). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), acontecem atualmente cerca de 270 mil mortes/ano por câncer cervical, sendo 40 mil em regiões mais desenvolvidas (Europa, América do Norte, Japão, Nova Zelândia e Austrália) e 230 mil nas menos desenvolvidas, com 5,2 milhões de habitantes (IARC,2002). A incidência por câncer de colo do útero torna-se evidente na faixa etária de 20 a 29 anos e o risco aumenta rapidamente até atingir

seu pico geralmente na faixa etária de 45 a 49 anos. Em países desenvolvidos, a sobrevida média estimada em cinco anos varia de 59 a 69%. Nos países em desenvolvimento, os casos são encontrados em estádios relativamente avançados e, conseqüentemente, a sobrevida média é de cerca de 49% após cinco anos (INCA, 2008).

Nos países desenvolvidos, a incidência do câncer de colo uterino encontra-se em declínio, principalmente em função do sucesso das campanhas de prevenção, baseadas nos testes citológicos de Papanicolaou. Entretanto, nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, a incidência do câncer cervical ainda é muito alta e um grande número de novos casos (cerca de 80% do total mundial) continua sendo detectado (Waggoner, 2003; Hoory *et al.*, 2008). Sua prevalência é cerca de duas vezes maior em países menos desenvolvidos comparada com os mais desenvolvidos. Nos Estados Unidos, são diagnosticados anualmente cerca de 12.000 casos de câncer cervical, 330.000 casos de neoplasia cervical de alto grau (NIC II/III) e 1,4 milhões de casos de neoplasia intraepitelial de baixo grau (NIC I) (Schiffman & Solomon, 2003; Jemal *et al.*, 2006). As taxas de incidência, nos Estados Unidos, variam consideravelmente em virtude das diferenças sócio-econômicas e étnicas. Devido à etnia ou ao nível sócio-econômico, as taxas de incidência de câncer cervical e suas lesões precursoras em mulheres negras são duas vezes mais altas comparadas às mulheres brancas (Freman & Wingrove, 2005). Apesar das taxas de prevalência do HPV serem similares na população em geral, essas diferenças com relação à incidência do câncer cervical e suas lesões precursoras são amplamente atribuídas aos diferentes acessos aos serviços de prevenção do câncer de colo do útero, como o exame de Papanicolaou e o tratamento excisional das lesões precursoras (Hoory *et al.*, 2008).

Apesar da existência de estratégias eficazes para sua prevenção, o câncer de colo do útero continua sendo um grave problema de saúde pública especialmente nos países em desenvolvimento (Parkin *et al.*, 1999; Bosch & de Sanjosé, 2003). As mais altas taxas de incidência ocorrem na América Central (44,44/100.000), em algumas partes da Ásia (43,40/100.000) e no sul da África (40,44/100.000). Na América Latina, a incidência também é alta, variando de 31,79/100.000 no norte, e 27,69/100.000 no sul do continente (Parkin *et al.*, 1999;

Bosch & de Sanjosé, 2003). No Brasil, o câncer cervical representa o terceiro mais freqüente entre as mulheres, sendo que mais de 70% dos diagnósticos ocorrem em fases avançadas da doença (MS, 2001). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2008) o número de casos novos calculado para 2008 foi de 18.680 casos, com um risco estimado de 19 casos a cada 100 mil mulheres. Em Goiás, estima-se 19,08 casos de câncer cervical a cada 100 mil mulheres, em 2008 (INCA, 2008).

No Brasil, o câncer de colo uterino é o de maior incidência na região norte (22,2/100 mil), o segundo nas regiões Sul (24,4/100 mil), Centro-Oeste (19,08/100 mil) e Nordeste (17,58/100 mil) e, na região Sudeste, o terceiro mais freqüente (17,83/100 mil) (INCA, 2008). A Figura 2 mostra a distribuição espacial dos coeficientes de incidência estimados para o câncer de colo do útero em 2008, no Brasil. A estatística nacional demonstra uma média de 4 mil óbitos por ano por carcinoma do colo uterino, com uma taxa de mortalidade de 3,5 óbitos por 100.000 habitantes. Cerca de 15% a 20% das mulheres até os 25 anos são portadoras do HPV e, delas, 30% a 40% desenvolverão lesões pré-neoplásicas e neoplásicas no colo uterino, num intervalo de 10 a 15 anos (Ferlay *et al.*, 2004).

A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) é um importante problema de saúde pública, sendo que mais de 98% dos tumores cervicais são causados por este vírus (Bosch & de Sanjosé, 2003). Desde a década de 70, quando Harald Zur Hausen fez os primeiros relatos sugerindo o papel do HPV no desenvolvimento do câncer cervical, mais de 100 tipos de HPV, que infectam células epiteliais da pele e de algumas mucosas, tiveram sua sequência de DNA completamente identificada (zur Hausen, 2000). Os tipos que infectam a mucosa podem ainda ser classificados em alto risco, encontrados predominantemente no câncer cervical e em lesões de alto grau, e em baixo risco, constatados comumente nas verrugas genitais, sendo que a co-infecção pelos dois tipos virais é um achado freqüente (Myers *et al.*, 2000). O câncer cervical de células escamosas se desenvolve a partir de lesões pré-cancerosas bem definidas, com potencial para progredir para a doença invasiva se não forem detectadas e tratadas precocemente. Existem evidências epidemiológicas de que a infecção persistente, com alta carga viral por tipos oncogênicos do HPV, desempenha um

papel importante no desenvolvimento do câncer do colo uterino (Bory *et al.*, 2002; Schiffman *et al.*, 2005; Bekkers *et al.*, 2006).

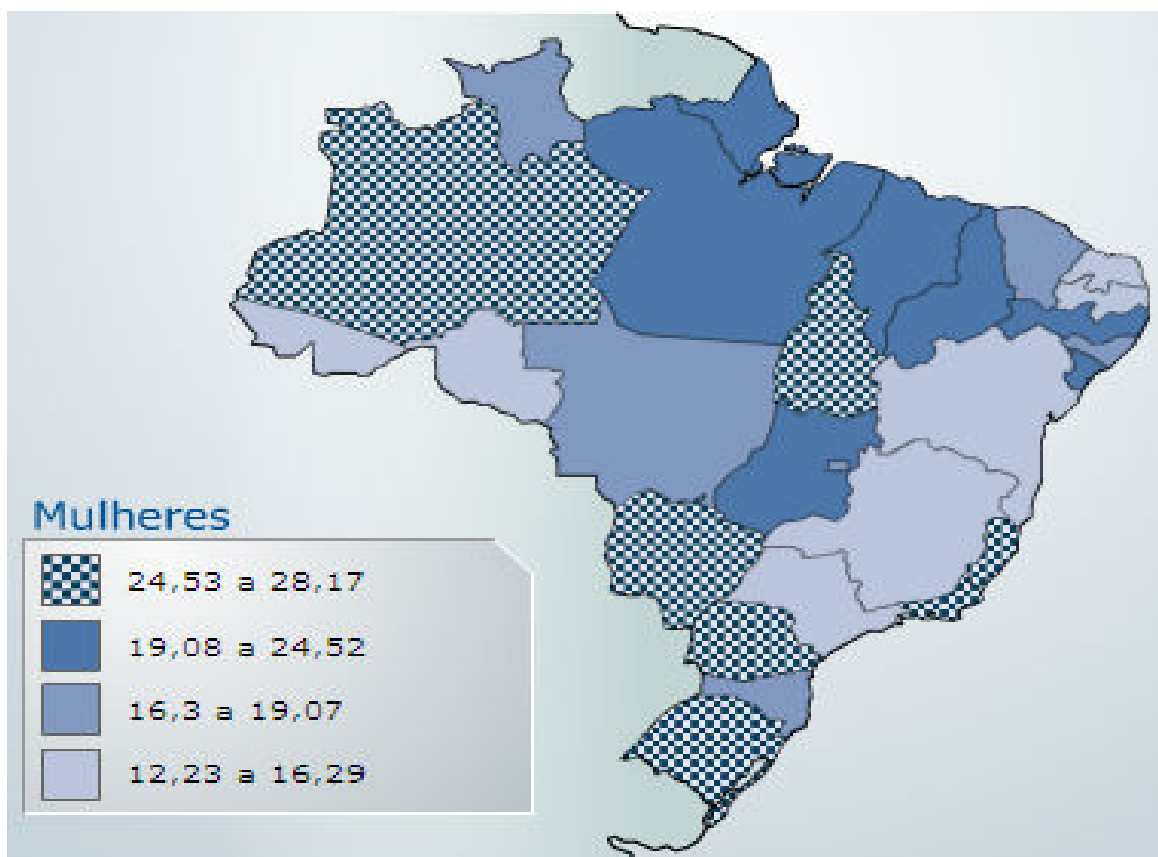


Figura 2 – Representação espacial dos coeficientes de incidência* estimados para o câncer do colo do útero, em mulheres, por Unidade da Federação, 2008.

Fonte: MS/Instituto Nacional de Câncer – INCA, 2008

* por 100 000 habitantes

Os HPVs de baixo risco quase nunca são encontrados em cânceres invasivos, enquanto os de alto risco são os mais frequentemente associados a esses tumores. É importante destacar que a infecção pelo HPV de alto risco oncogênico não implica, inevitavelmente, no desenvolvimento de câncer (Rivoire *et al.*, 2003). Durante mais de 20 anos, alguns tipos de HPV foram associados a tipos específicos de cânceres. Os principais representantes dos HPVs classificados como de baixo risco ou benignos são os tipos 6,11,42,43 e 44, que não induzem crescimento com concomitante desorganização em células escamosas e que estão associados com lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LSIL) (zur Hausen, 1996; Nobbenhuis *et al.*, 1999; Franco *et al.*, 2001). As lesões de baixo grau com HPVs do tipo 6 e 11 representam um risco baixo ou

muito baixo para o carcinoma invasor. Esses genomas virais permanecem na forma extracromossomal (forma episomal) levando a infecções produtivas, sendo a coilocitose o principal efeito citopático causado pelo vírus (Ferenczy *et al.*, 1985; Franco, 1995). Os tipos de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 são considerados de alto risco e estão relacionados à lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (HSIL) e carcinoma cervical.

Mais de 98% das lesões intra-epiteliais escamosas contêm o DNA do HPV, determinado por métodos de biologia molecular (Nobbenhuis *et al.*, 1999; zur Hausen, 1996; Franco *et al.*, 2001; Bosch *et al.*, 2002). Em estudo realizado em Porto Alegre-RS, foram analisadas 975 mulheres e a prevalência do DNA do HPV foi de 27%, pela combinação do método de PCR e Captura híbrida. Em mulheres que apresentaram citologia normal, o DNA do HPV foi detectado em 13,8% das amostras cervicais e nas mulheres com anormalidades citológicas, o DNA do HPV estava presente em 26,8% das mulheres com ASCUS, 55% com LSIL e em 50% com HSIL (Nonnenmacher *et al.*, 2002). Noronha *et al.* (2006) evidenciaram associação estatisticamente significativa entre a presença de HPV e resultado da citologia com alterações citológicas. Neste estudo, a prevalência do HPV foi de 12,6%, sendo de 44,1% nas pacientes que apresentaram citologia anormal e de 8,3% nas pacientes com citologia normal. No grupo de mulheres que apresentaram anormalidades citológicas, o DNA do HPV foi prevalente em 34% das pacientes com ASCUS, 71,4% com LSIL e 83,3% com HSIL. Tipos de HPV considerados de alto risco foram detectados em 39% das mulheres com anormalidades citológicas, sendo que os tipos de HPV de alto risco estavam presentes em 28% das mulheres diagnosticadas com ASCUS, 71% com LSIL e em 83% com HSIL. No grupo de mulheres com citologia normal, 4,4% apresentavam HPV de alto risco.

Outro estudo realizado no Brasil demonstrou que a prevalência do HPV foi estimada em 38,5% das mulheres sexualmente ativas, sendo o HPV-16 o tipo mais frequente. Achados citológicos anormais foram observados em 17,8% das mulheres, sendo 10,7% com ASCUS, 6% com LSIL e 0,8% com HSIL. Os HPV de alto risco foram detectados em 53,3% das mulheres com ASCUS, em 81,3% com LSIL e em 72,2% com HSIL (Souza, 2004). A persistência da infecção por HPV de alto potencial oncogênico é necessária, mas não é suficiente para o

desenvolvimento do câncer cervical (Walboomers *et al.*, 1999). Habitualmente, a infecção por HPV é um fenômeno transitório, sendo que em 90% dos casos, ela não é mais detectada após 36 meses (HO *et al.*, 1998), entretanto, uma pequena fração de mulheres, provavelmente por falha de mecanismos imunológicos, apresenta persistência da infecção, que pode provocar alterações atípicas no epitélio cervical e evoluir para transformação maligna (Myers *et al.*, 2000; Bosch *et al.*, 2002).

As mulheres que apresentam infecção persistente por HPV constituem o verdadeiro grupo de risco para o desenvolvimento do câncer cervical, com um risco relativo de 100 a 300 vezes em relação àquelas cuja infecção não foi persistente (Bory *et al.*, 2002; Bekkers *et al.*, 2006). Um estudo importante demonstra que em mulheres infectadas pelo HPV, o risco de desenvolver câncer de colo uterino é 19 vezes maior. Mulheres com os tipos oncogênicos 18, 31 ou 33 têm um risco maior do que 50 vezes comparado ao daquelas não infectadas e, se considerado o HPV 16, este risco aumenta mais de 100 vezes (van der Graaf *et al.*, 2002).

A infecção genital por HPV é mais freqüente em jovens, com maior prevalência na faixa entre 20 e 24 anos. Dentre as mulheres infectadas, 80% não apresentam sintomas clínicos e em cerca de 60 a 70% dos casos a infecção regride espontaneamente. Somente em 14% dos casos, observa-se progressão para lesões intra-epiteliais (Schiffman *et al.*, 1991). Schiffman *et al.* (1991) acompanharam 500 mulheres portadoras de neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) em diferentes graus, estabelecendo os fatores epidemiológicos de risco associados à infecção pelo HPV. Os fatores típicos foram: múltiplos parceiros sexuais, infecção pelo herpes vírus, excesso de fumo e álcool, primeiro intercurso sexual em idade precoce e baixas condições sócio-econômicas. No Brasil, as lesões cérvico-vaginais de alto grau associadas ao HPV estão relacionadas ao número de parceiros sexuais, idade precoce do primeiro intercurso sexual e tempo de uso de contraceptivos orais (Chen *et al.*, 1993).

O câncer cervical de células escamosas se desenvolve a partir de lesões pré-cancerosas bem definidas, com potencial para progredir para doença invasiva, se não forem detectadas e tratadas precocemente (Munoz *et al.*, 2003). Estima-se que o número de lesões precursoras do câncer é superior ao número

de tumores de 10 a 20 vezes, implicando em grande número de indivíduos afetados (Ferlay *et al.*, 2004). O diagnóstico precoce e o controle dessas neoplasias têm sido baseado, há mais de quarenta anos, na observação de alterações morfológicas em esfregaços cervicais pelo método de Papanicolaou. Em países em que a triagem cervical tem sido estendida para a maioria da população, observou-se uma significativa redução na incidência e na mortalidade pelo câncer cervical. No Brasil, menos de 15% das mulheres estão envolvidas em programas de prevenção contra o câncer cervical, justificando em parte, a alta incidência dessas neoplasias em nosso país (Bosch & de Sanjosé, 2003).

A citologia é um método acessível, rápido e barato que pode ser utilizado no rastreamento de infecções pelo HPV na população em geral. Porém, a taxa apreciável de resultados falso-negativos e a variação interobservador tornam necessário o uso de outros métodos de diagnóstico (Fahey *et al.*, 1995; Bastian *et al.*, 1999; Nanda *et al.*, 2000). Os testes moleculares para HPV, baseados na detecção do DNA viral podem demonstrar os tipos de HPV de alto risco em células obtidas durante a triagem citológica de rotina. Os resultados de vários estudos têm destacado a falta de sensibilidade da citologia de rotina e indicado o exame de detecção do DNA do HPV pela sua alta sensibilidade (aproximadamente 95%) para identificar a neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau (NIC II e NIC III) ou neoplasia glandular (Cuzick *et al.*, 1999; Clavel *et al.*, 1999; Lorincz *et al.*, 2003). Os testes para detecção do DNA do HPV podem ser considerados como exames diagnósticos adjuntos à citologia convencional, nos programas de prevenção ao câncer cervical ou uma ferramenta importante de triagem. O uso potencial dos testes para detecção do DNA do HPV incluem: a triagem de pacientes com resultado de ASCUS pelo teste de Papanicolaou, resolução de citologia discordante, achados colposcópicos ou histológicos, seguimento após o tratamento para avaliar a “cura” da paciente, seguimento após colposcopia normal ou triagem populacional como um teste primário ou como um adjunto à citologia convencional de Papanicolaou (Lorincz *et al.*, 2003).

1.4 Doença cervical uterina na população feminina soropositiva para o HIV

A imunidade local e sistêmica é considerada um fator determinante para as infecções pelo HPV e pode determinar o desenvolvimento de infecção primária persistente, sendo este o mais importante fator de risco para a neoplasia cervical. A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) está associada a uma alta prevalência do HPV, alta incidência de lesões intraepiteliais escamosas (SIL) e alto risco para o desenvolvimento do câncer cervical em mulheres soropositivas (Delmas *et al.*, 2000; Ellerbrock *et al.*, 2000; Frisch *et al.*, 2000; Ahdieh *et al.*, 2001; Cardillo *et al.*, 2001; Palefsky & Holly, 2003).

Estudos prospectivos, usando a técnica de PCR para detecção do genoma do HPV, têm mostrado que a incidência da infecção é mais alta (cerca de 95%) em mulheres positivas para o HIV, comparadas com mulheres HIV negativas (22%). Nas pacientes HIV positivas, as infecções pelo HPV são persistentes e frequentemente envolvem múltiplos genótipos virais (Sun *et al.*, 1995; Luque *et al.*, 1999). A imunossupressão observada em pacientes HIV positivas parece levar a uma eliminação menos eficiente dos queratinócitos infectados pelo HPV e conseqüentemente a uma progressão das lesões (Crowley-Nowick *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 2001). A replicação aumentada do DNA do HPV pode ser uma consequência direta ou indireta dos efeitos do HIV, dos efeitos sinérgicos resultantes de infecções com múltiplos genótipos do HPV ou de co-infecções com outros agentes transmitidos sexualmente, como o Herpes Simples (Wieland *et al.*, 2000).

A resposta imune específica ao HPV desempenha um importante papel no controle das lesões intraepiteliais precursoras do câncer cervical. A imunossupressão causada pelo HIV impede essa imunidade específica. Conseqüentemente, verifica-se uma alta carga viral do HPV, com infecções persistentes, levando a um risco aumentado para o desenvolvimento da neoplasia cervical (Delmas *et al.*, 2000; Heard *et al.*, 2000). A evolução das lesões para a malignidade pode ser esperada, frente ao grande pool de células infectadas pelo HPV e ao aumento das concentrações de oncoproteínas virais. Todos esses mecanismos podem contribuir para um curso mais agressivo das infecções cervicais pelo HPV em pacientes HIV positivas (Weissenborn *et al.*, 2003).

Vários estudos demonstram que um aumento da carga viral do DNA do HPV representa um fator importante para o desenvolvimento de SIL em mulheres soropositivas para o HIV (Shah *et al.*, 1997; Womack *et al.*, 2000; Weissenborn *et al.*, 2003), entretanto, controvérsias têm sido reportadas (Tweddel *et al.*, 1994; Boccalon *et al.*, 1996). Dois grandes estudos confirmaram um aumento na incidência de SIL em pacientes HIV positivas, demonstrando ser o HIV um potente fator de risco para as lesões intraepiteliais escamosas, independente da carga viral mencionada (Conti *et al.*, 1993; Wright & Sun, 1996).

A contagem de células CD4+, o estado da AIDS e a carga de RNA do HIV refletem a imunossupressão severa, em pacientes HIV-positivas e estes fatores estão associados com aumento da carga viral do HPV em pacientes com SIL (Heard *et al.*, 2000; Weissenborn *et al.*, 2003). A presença de múltiplos genótipos do HPV em pacientes HIV positivas também foi encontrada em vários estudos, notificando que os tipos oncogênicos -16 e -18 são os mais prevalentes (Cappiello *et al.*, 1997; Gonçalves *et al.*, 1999; Palefsky *et al.*, 1999; Ellerbrock *et al.*, 2000; Heard *et al.*, 2000; Weissenborn *et al.*, 2003).

O estabelecimento de estratégias adequadas para a prevenção e o tratamento do câncer cervical em pacientes HIV positivas requer o conhecimento da história natural da infecção pelo HPV e o desenvolvimento da neoplasia intraepitelial cervical (NIC) nessas pacientes. Uma vez que o HIV parece alterar a história natural da infecção pelo HPV, com taxas de regressão diminuídas e progressão para lesões de alto grau e lesões invasoras refratárias ao tratamento, intervenções mais efetivas, para monitorar e controlar essas infecções tornam-se bastante relevantes (Palefsky & Holly, 2003; Spinillo *et al.*, 2006).

As interações entre esses dois vírus provavelmente ocorrem via proteínas virais, com as proteínas do HIV realçando os efeitos das proteínas do HPV e provavelmente contribuindo para a desregulação do ciclo celular (Palefsky & Holly, 2003). A imunidade local e sistêmica prejudicada pode assegurar a progressão da doença, embora o curso dessa história seja ainda incerto. Outro questionamento importante a ser feito, diz respeito à associação entre tipos específicos do HPV e o grau das lesões intraepiteliais cervicais, como observado na população em geral. Alguns estudos demonstram uma associação similar entre lesões de alto grau em pacientes positivas para o HIV e determinados tipos

oncogênicos do HPV, sugerindo uma incidência aumentada dos tipos de alto risco para as lesões precursoras de baixo grau (Sun *et al.*, 1997). Outros estudos relatam que as lesões de alto grau estão associadas tanto com tipos de HPV de baixo e/ou alto risco, levando às especulações de que o HIV pode aumentar a oncogenicidade dos tipos de alto risco e possivelmente conferir tal atividade aos HPVs de baixo risco (Tweddel *et al.*, 1994; Tornesello *et al.*, 2008).

1.5 Papilomavírus Humano

1.5.1 Características

Os papilomavírus constituem um grupo de pequenos vírus pertencentes à família *Papillomaviridae*, gênero *alfa*, *beta*, *gama-papillomavirus*, capazes de infectar animais e homens. O HPV possui um genoma de DNA de dupla fita, circular, não envelopado, com simetria icosaédrica e constituído por 7.200 a 8.000 pares de base (Doorbar, 2005; Concha, 2007). O material genético está envolto por um capsídeo, que possui um diâmetro de 50nm. Este por sua vez, possui 72 subunidades (capsômeros), formadas por duas proteínas estruturais, denominadas de L1 e L2 (Modis *et al.*, 2002; Hoory *et al.*, 2008). A proteína principal que compõe o capsídeo viral, L1, é gênero-específica, serve como medidor direto de infectividade, possui cerca de 55 kD e representa em torno de 80% de toda a proteína viral. A proteína secundária do capsídeo viral, L2, é altamente tipo-específica, tendo cerca de 70 kD (Brown *et al.*, 1993; Modis *et al.*, 2002).

1.5.2 Classificação

Os HPVs são vírus epiteliotrópicos e mucosotrópicos, afetando predominantemente pele e mucosas e podendo induzir no homem uma grande variedade de lesões proliferativas no sítio de infecção (de Villiers *et al.*, 2004; Bernard *et al.*, 2006). Os HPVs são altamente espécie-específico, não havendo nenhum caso relatado na literatura, até o momento, em que o papilomavírus de uma espécie cause infecção produtiva em outra espécie (IARC, 1995; Concha, 2007). Os papilomavírus são também divididos em duas categorias de risco

(Tabela 1) para o desenvolvimento de neoplasias, os de baixo risco ou tipos não-oncogênicos e os de alto risco ou tipos oncogênicos (Villa,1998) . Os tipos de HPV de baixo risco são encontrados mais comumente em lesões benignas, principalmente os condilomas. Já os tipos de HPV de alto risco estão associados a diferentes graus de lesões intra-epiteliais escamosas do colo do útero (Stevens, 2002) e de carcinomas cervicais (Noronha *et al.*, 1999; Rivoire *et al.*, 2001).

Atualmente, há mais de 200 tipos de HPV descritos, sendo que 96 tipos já foram identificados, com seus genomas inteiros isolados e completamente sequenciados e menos de 100 tipos de HPV foram sequenciados em parte (de Villiers *et al.*, 2004). Aproximadamente, 40 tipos infectam o trato anogenital, sendo que, pelo menos, 20 estão associados ao carcinoma do colo do útero (de Villiers, 2001).

TABELA 1. Classificação dos HPVs quanto ao tropismo e categoria de risco para o desenvolvimento de neoplasias.

Classificação	Categoria	Genótipo de HPV	Natureza da lesão	Lesão
Tropismo	Epiteliotrópicos	1 e 2	Benigna	Verrugas
		5 e 8	Maligna	Ca* de pele
	Mucosotrópicos	6, 11 e 42	Benigna	Condilomas
		16, 18, 31 e 45	Maligna	Ca cervical
Risco Oncogênico	Baixo risco	6, 11, 26,42,44,54,70 e 73	Benigna	Condilomas
	Alto risco	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 55, 56, 58, 59, 66 e 68	Maligna	Ca cervical

*Ca: Carcinoma

1.5.3 Genes virais

O genoma do HPV está dividido em três regiões, denominadas ORFs (Open Reading Frames ou unidades de tradução), as quais se encontram em uma mesma fita de DNA, hoje, conhecidas como genes que codificam as proteínas virais. No genoma viral, existem três fragmentos sub-genômicos, que podem ser identificados: região precoce (*Early*), que representa 45% do genoma, região

tardia (*Late*), que representa 40% do genoma e a região denominada NCR (*non-coding region*) ou LCR (*Long Control Region*), que representa 15% do genoma e contém elementos regulatórios da transcrição e da replicação viral (Dehn *et al.*, 2007; Hoory *et al.*, 2008). A Figura 3 mostra a árvore filogenética do HPV baseado na ORF L1.

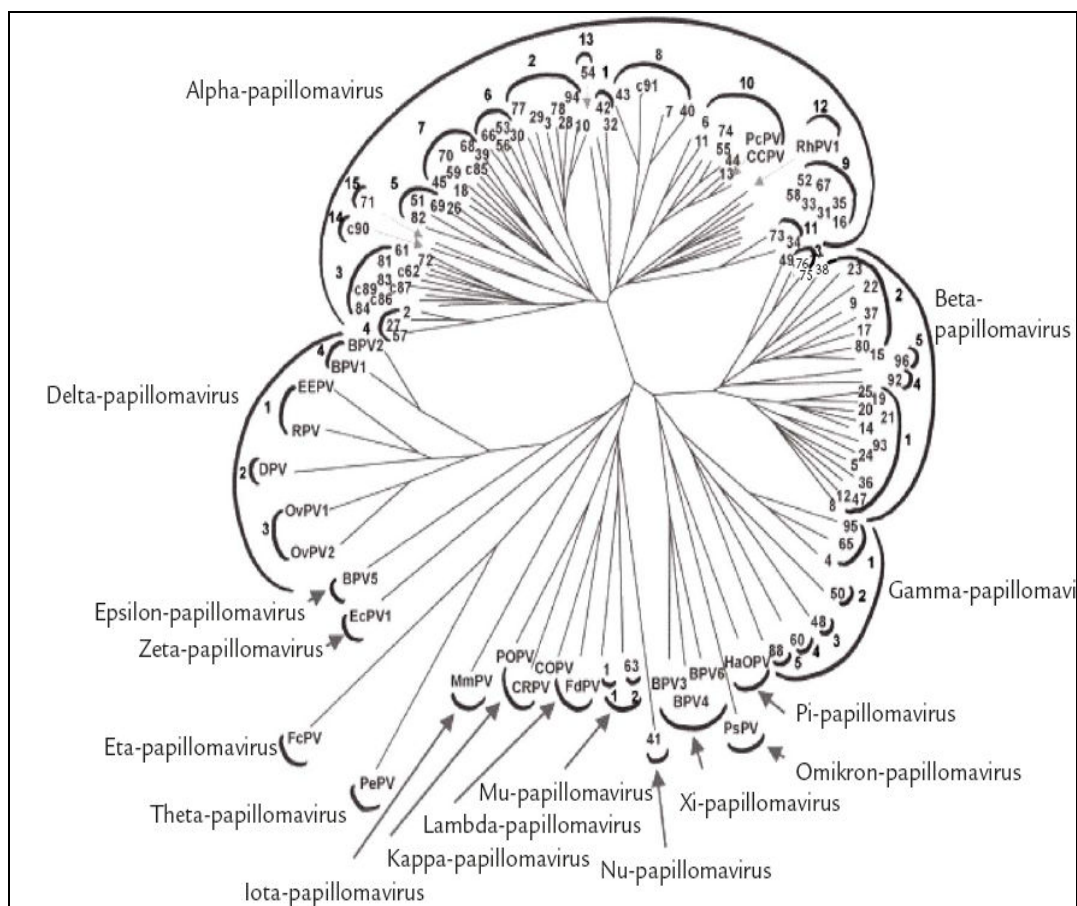


Figura 3 – Árvore filogenética do papilomavírus. A sequência da ORF L1 foi usada para classificar os papilomavírus e montar sua árvore filogenética (Modificado de Hoory *et al.*, 2008).

Na região precoce, as sequências E, E1, E2, E4, E5, E6 e E7 garantem a replicação do maquinário genético do vírus, ou seja, tem a função de codificar proteínas responsáveis pela transformação e replicação. O gene E1 têm importante função na replicação, os gene E1 e E2 na transcrição e os genes E5, E6 e E7 na transformação celular (zur Hausen, 2000). A Figura 4 mostra o mapa genético do HPV-16.

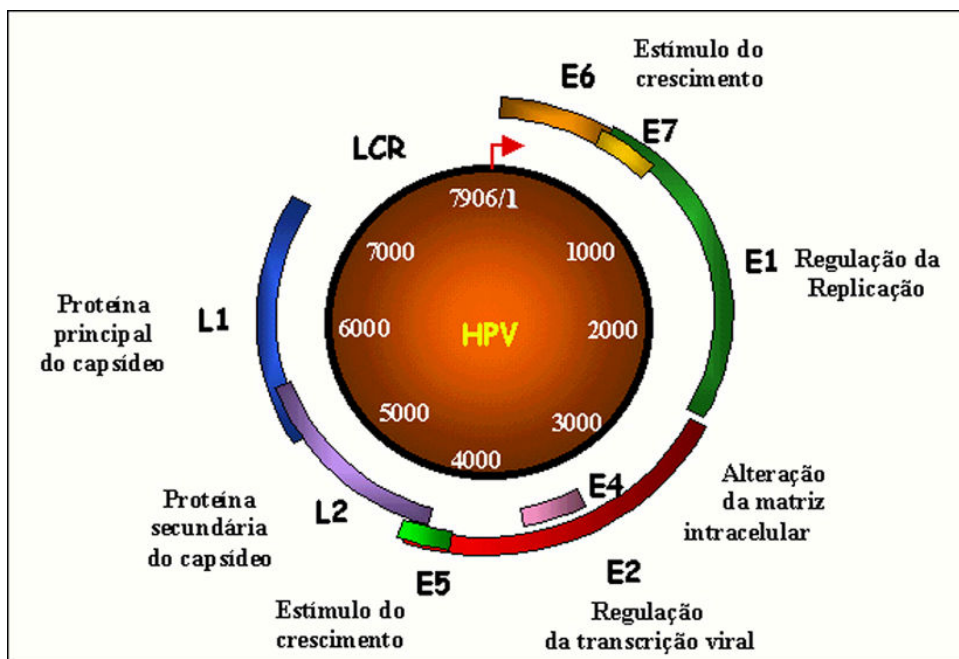


Figura 4 – Estrutura representativa do genoma do HPV-16. Região precoce (*Early*), região tardia (*Late*) e LCR (*Long Control Region*) que corresponde à região regulatória (Modificado de Villa, 1997).

A proteína codificada pelo gene E2, controla a transcrição dos genes virais E6 e interage com E1 na estimulação da replicação, por facilitar a ligação de E1 à origem de replicação. A detecção da proteína E4 é feita nas camadas mais diferenciadas do epitélio infectado, durante o ciclo reprodutivo viral (Palesfky *et al.*, 1991. Doorbar *et al.*, 2005). A proteína E5 é a principal proteína transformante dos papilomavírus bovinos enquanto que nos HPV apresenta apenas uma fraca atividade de transformação, amplificando o sinal mitogênico do receptor de crescimento epidérmico (zur Hausen, 2000).

A expressão do gene E6 resulta em uma proteína nuclear de cerca de 150 aminoácidos, que se liga ao produto do gene p53, levando à sua degradação pela via de proteólise dependente de ubiquitina (Scheffner *et al.*, 1993; zur Hausen, 2000, zur Hausen, 2006). A proteína p53 é responsável por monitorar danos ocorridos nas moléculas de DNA e tem como função a regulação do ciclo celular; por isso, é considerada como supressora tumoral (Doorbar *et al.*, 2005). A proteína E6 de HPVs de alto risco promove indiretamente a degradação da p53. A proteína E6 recruta a proteína celular E6AP, que funciona como uma ubiquitina-ligase resultando na ubiquitinação de p53, seguido de sua degradação. Assim, sua degradação, promovida pela proteína E6 do HPV, desregula o controle do

ciclo celular (Silva *et al.*, 2003). A figura 5 mostra a ação da p53 sobre o ciclo celular. Acreditava-se que apenas as proteínas E6 dos HPV de alto risco oncogênico fossem capazes de se ligar à p53 e devido ao fato de tanto pRb, como p53, serem proteínas supressoras de tumor e perderem sua função, o resultado é a proliferação celular descontrolada (Doorbar *et al.*, 2005; Andersson *et al.*, 2006). No entanto, um estudo desenvolvido por Storey *et al.* (1998) demonstrou que E6 do HPV-11 também é capaz de degradar p53, mas com menor intensidade do que a proteína do HPV-16. Uma observação importante é que somente as proteínas E6/E7 de HPV de alto risco oncogênico podem desempenhar a atividade de immortalização nos queratinócitos humanos primários e promover a transformação celular, mas as proteínas análogas dos HPV de baixo risco oncogênico não apresentam tais atividades (Andersson *et al.*, 2006).

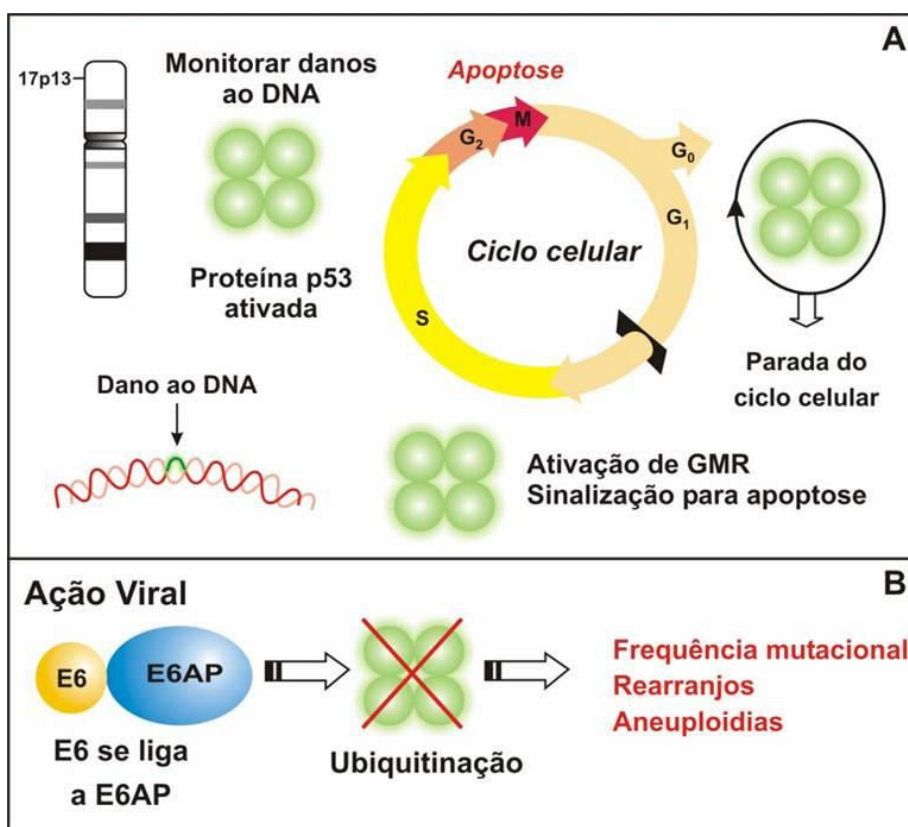


Figura 5 - Ação da proteína p53 sobre o ciclo celular. (A) A proteína p53 é codificada pelo gene p53, localizado no cromossomo 17p13. A proteína p53 tem a função de parar o ciclo celular no caso de identificação de danos ao DNA, dessa forma o ciclo é interrompido até que o dano seja reparado. No caso de danos extensos, a p53 pode induzir a apoptose. (B) A proteína viral E6 se liga a E6AP que funciona como uma ubiquitina-ligase, degradando p53. GMR: genes do mecanismo de reparo (Silva *et al.* 2003).

O produto do gene E7 é uma fosfoproteína, com cerca de 10 aminoácidos, que se liga à forma hipofosforilada da proteína celular pRb, produto do gene retinoblastoma, um gene supressor de tumor. A proteína E7 forma um complexo com as proteínas de controle do ciclo celular, como pRb, p107, p130 e ciclina A, e esta habilidade parece estar relacionada à sua capacidade de induzir proliferação e imortalização celular (zur Hausen, 2000). A associação E7-pRb faz com que pRb perca sua função de regular negativamente o ciclo celular, através da sua fosforilação específica ciclo-dependente, ou seja, pRb defosforilada é capaz de inibir a progressão do ciclo celular por ligação específica ao fator de transcrição E2F (Figura 6). A associação da proteína pRb com a proteína viral E7 causará uma perturbação no controle normal do ciclo celular, resultando em um estímulo excessivo para a proliferação das células infectadas. A proteína E7, dos tipos de HPV de alto risco oncogênico, como 16 e 18, ligam-se a pRb com maior afinidade que aquelas obtidas dos tipos cervicais classificados como de baixo risco oncogênico, por exemplo, os tipos 6 e 11 (O'Connor *et al.*, 1997; zur Hausen, 2000).

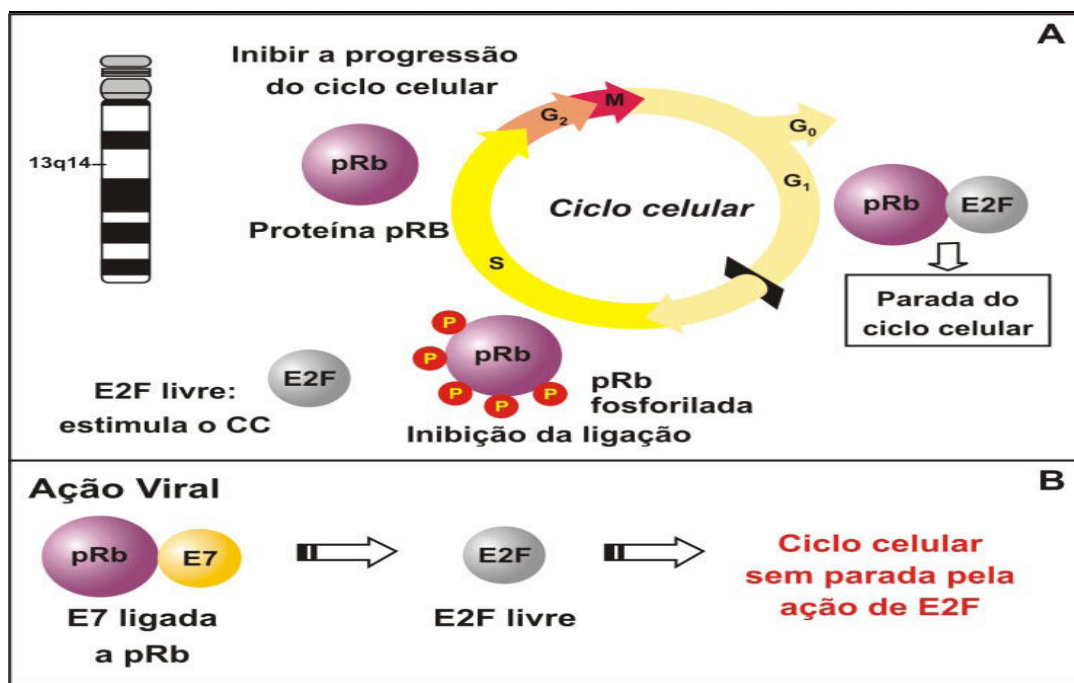


Figura 6 - Ação da proteína pRb sobre o ciclo celular. (A) A proteína pRb é codificada pelo gene RB1, localizado no cromossomo 13p14. A ligação da proteína pRb ao fator de transcrição E2F resulta na parada do ciclo celular. A fosforilação de pRb libera E2F que ativa a transcrição de genes alvo para a replicação do genoma. (B) A proteína viral E7 se liga a proteína pRb, liberando E2F e causando estímulo constante para a divisão celular (Silva *et al.* 2003).

Os genes L1 e L2, de expressão tardia, codificam proteínas principais e secundárias do capsídeo, respectivamente, e ambos são sequências altamente conservadas entre todos os papilomavírus. Conforme mencionado anteriormente, a proteína L1 é a mais abundante no capsídeo viral e constitui cerca de 80% do total das proteínas virais. Ela possui ainda epítomos tipo-específicos e é altamente imunogênica. A proteína L2, associada à L1, participa da incorporação do DNA viral à célula hospedeira (Hoory *et al.*, 2008). A origem de replicação viral está localizada numa região de 500 a 1.000 pares de bases, entre L1 e E6, designada LCR (*Long Control Region*) ou URR (*Upstream Regulatory Region*). Nesta região foram mapeados vários sítios para ligação de elementos regulatórios virais (proteínas E2) ou celulares (diversos fatores de transcrição), elementos responsivos a hormônios glicocorticóides e progesterona que, em conjunto, determinam a modulação positiva ou negativa da transcrição do genoma viral (IARC, 1995; Howley, 1996).

1.5.4 Ciclo de vida

Há dois modos de replicação dos papilomavírus (Villa, 1997; zur Hausen, 2002). O primeiro ocorre nas células da camada basal da epiderme, onde o genoma viral é mantido de forma estável em cópias múltiplas, sendo distribuído homoganeamente entre as células-filhas. Este tipo de replicação garante uma infecção persistente das células proliferativas da camada basal. Outra forma de replicação do DNA é a vegetativa, que ocorre nas camadas mais diferenciadas da epiderme; tais genomas virais, em múltiplas cópias, são finalmente montados em partículas virais maduras ou vírions.

Acredita-se que a infecção pelo HPV tenha lugar primeiramente nas camadas basais da epiderme, em decorrência de abrasão ou de microlesões da pele ou mucosa. Interessantemente, 90% das patologias associadas ao HPV no colo do útero localizam-se na transição escamocolunar do epitélio ou zona de transformação, onde as células proliferativas estão mais expostas (Villa, 1997). Na camada proliferativa, o vírus pode se replicar e expressar suas proteínas precoces. No entanto, a replicação vegetativa do DNA viral, a síntese das proteínas do capsídeo e a montagem das partículas virais só têm lugar nas

células mais diferenciadas. Este deve ser o motivo pelo qual é impossível propagar os HPVs em cultura de células (zur Hausen, 2000).

Os mecanismos de infecção dos papilomavírus, desde sua adesão à superfície celular, transporte ao núcleo e perda do capsídeo, ainda não são completamente entendidos. Após a adesão às células superficiais do epitélio escamoso, os vírions penetram por áreas de abrasão ou de epitélio imaturo presente na junção escamocolunar (JEC) e na zona de transformação da cérvix uterina, região de maior tropismo para HPVs de alto risco. Após a penetração, ocorrem perda parcial ou total do capsídeo e exposição do genoma, usualmente de nucleoproteína. Ao chegar ao núcleo das células epiteliais basais e parabasais, o HPV está pronto para continuar seu ciclo de replicação, executando a transcrição do DNA em RNA mensageiro (RNAm), e, pela interação de fatores celulares com a LCR, inicia a transcrição de E6 e E7. As proteínas E1 e E2 são as próximas a serem sintetizadas. A proteína E2 bloqueia a transcrição precoce de E6 e E7, liberando a ação das proteínas p53 e p107 Rb, e o processo de diferenciação epitelial continua. Os genomas virais episomais permanecem no núcleo das células basais infectadas e são distribuídos para as células-filhas durante a mitose, as quais funcionam como reservatórios virais. Essa infecção pelo HPV, sem qualquer lesão diagnosticável, é dita latente (zur Hausen, 2000; Giarré *et al.*, 2001; Hildesheim & Wang, 2002; zur Hausen, 2008). O ciclo reprodutivo do HPV pode ser observado na Figura 7.

O período mínimo entre a infecção e a liberação das partículas de HPV, é, em média, de três semanas. Durante essa fase, grande parte das lesões é eliminada pelo sistema imune espontaneamente, mas em alguns casos, os vírus podem escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro resultando em uma infecção persistente (Munoz *et al.*, 2004). A integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira parece ocorrer ao acaso. Os tipos virais que integram com mais frequência ao genoma humano são os tipos 16 e 18 (Munoz *et al.*, 2004). É importante ressaltar que as infecções por HPV, isoladamente, não são capazes, por si só, de induzirem progressão para lesões precursoras, sendo que menos de 2% das lesões induzidas por esses vírus evoluirão para a neoplasia invasora, o que demonstra a necessidade de outros eventos moleculares (Meijer *et al.*, 2000). Por outro lado, nas lesões benignas, induzidas pelo HPV, o DNA viral é

encontrado na forma episossomal, ou seja, não integrado ao genoma da célula hospedeira e em múltiplas cópias.

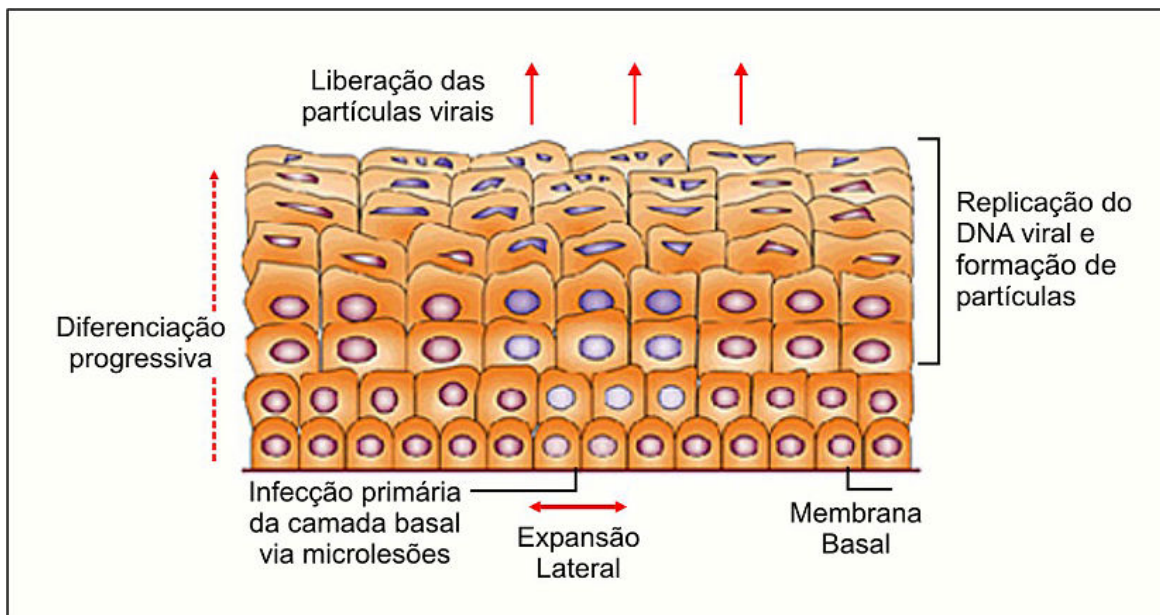


Figura 7 – O ciclo reprodutivo do HPV. Para que a infecção seja produtiva, o vírus precisa infectar a camada basal e isso normalmente ocorre através de microlesões na pele ou na mucosa. As células infectadas ao se dividirem espalham-se lateralmente. Algumas dessas células progenitoras migram para as camadas diferenciadas suprabasais, onde os genes virais são ativados, o DNA é replicado e as proteínas do capsômero são formadas. As partículas virais surgem e são liberadas juntamente com a descamação celular, na superfície da mucosa, podendo infectar células próximas (Modificado de zur Hausen, 2002).

1.5.5 Transformação celular

Os papilomavírus de alto risco representam fatores diretos na carcinogênese cervical. Os genes E6 e E7 do HPV são responsáveis pelo desenvolvimento do câncer cervical e suas lesões precursoras, sendo também necessários para a conservação do fenótipo maligno das células cancerosas (zur Hausen, 2006). A progressão para o câncer é acompanhada por modificações nos genes envolvidos na cascata de sinalização celular. Dois eventos mutacionais aparentemente contribuem para o caminho da progressão para o câncer, sendo que o primeiro envolve modificações na regulação dos inibidores de quinase dependentes de ciclinas $p16^{\text{INK4}}$ (Reznikoff *et al.*, 1996) e $p14^{\text{ARF}}$ (Sekaric *et al.*, 2007). Essas proteínas exercem um controle funcional nas células proliferativas normais. O efeito inibidor da $p16^{\text{INK4}}$ na proliferação celular é bloqueado por E6. A

proteína p14^{ARF} interfere negativamente com E7 via ativação de p53. Esse caminho é bloqueado pela expressão de E6, resultando na degradação de p53 (Pan *et al.*, 2003; zur Hausen, 2008). Essa perda da regulação na cascata de sinalização pela modificação desses genes celulares específicos parece corresponder clinicamente ao desenvolvimento de LSIL e a uma imortalização dessas células, observadas em cultura de tecidos (zur Hausen, 2008).

Um terceiro controle transcricional é exercido por um mecanismo parácrino, resultando na excreção de citocinas específicas, principalmente o fator alfa de necrose tumoral, ativado por macrófago (Soto *et al.*, 2000). Em células infectadas pelo HPV, que ainda são capazes de proliferar, esse mecanismo interfere na maioria dos transcritos virais. Em estágios mais tardios de progressão, a perda deste controle é acompanhada por uma alta expressão nos níveis das oncoproteínas virais. Clinicamente isso corresponde ao desenvolvimento de HSIL, carcinoma *in situ* e conseqüentemente, por modificações genéticas adicionais, para o câncer invasivo com formação de metástase (zur Hausen, 2008). Um esquema deste modelo de progressão é mostrado na Figura 8.

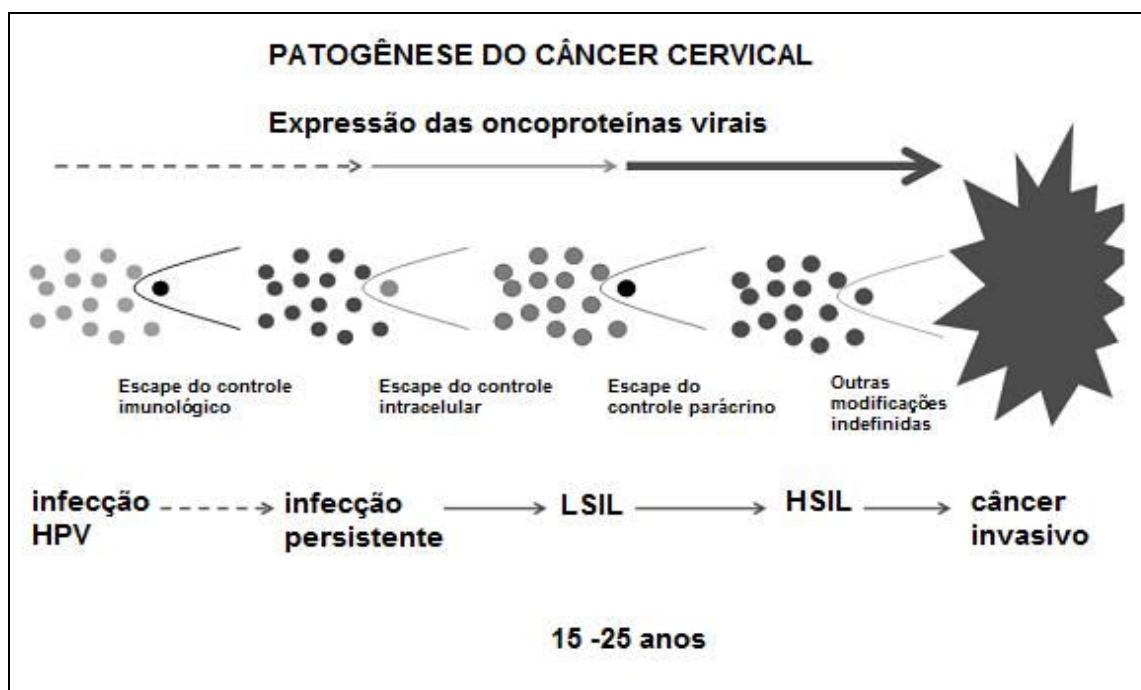


Figura 8 – O desenvolvimento do câncer cervical após a infecção primária comumente acontece entre 15 e 25 anos. Os eventos estão sistematicamente esboçados nesta figura (Modificado de zur Hausen, 2008).

1.5.6 Patogênese

A infecção pelo HPV tem sido descrita sob três formas de apresentação: clínica, subclínica e latente. As manifestações clínicas clássicas da infecção produtiva são as lesões condilomatosas, ou verrugas. Manifestam-se pela presença de lesões exofíticas, com superfície granulosa, frequentemente múltipla, da cor da pele, eritematosa ou hiperpigmentada e de tamanho variável. As lesões maiores assemelham-se à couve-flor e as menores apresentam-se com aspecto de pápula, placa ou ainda filiformes (Handsfield *et al.*, 1997). Nessas lesões, as células com vírus em replicação revelam o efeito citopático característico de lesão intra-epitelial de baixo grau, conhecido como halo de coilocitose (Stoler & Schiffman, 2001). Lesões subclínicas foram inicialmente descritas por Meisels e colaboradores, em 1977. Nesta forma, a infecção pelo HPV caracteriza-se por áreas difusas de hiperplasia epitelial não-papilífera da camada germinativa basal e alterações citológicas características. A diferença histológica do condiloma é a sua forma papilar, enquanto a forma subclínica é plana ou micropapilar (Stoler & Schiffman, 2001). Na forma latente, a infecção pelo HPV só pode ser diagnosticada por meio de técnicas de biologia molecular, não havendo evidências clínicas, citológicas ou histológicas (Lauro *et al.*, 2000). Na latência, acredita-se que o DNA viral encontra-se na forma episomal, aparentemente, sem atividade e replicando-se apenas uma vez a cada ciclo celular. Como a infecção nessa fase não é produtiva não existem alterações citológicas decorrentes de sua presença.

1.5.7 Vacina

A maioria das infecções por HPV, mesmo por tipos oncogênicos, cursa na forma subclínica e têm cura espontânea dentro de um ou dois anos. Entretanto, a persistência da infecção pelo HPV pode provocar o desenvolvimento de neoplasias como a NIC-III, que se não forem detectadas e tratadas podem evoluir para o câncer cervical. Estima-se que o tempo de infecção até o surgimento de NIC-III oscile entre um e 10 anos (Moscicki *et al.*, 2006). Nos países desenvolvidos a implantação dos programas de *screening* do câncer cervical com

testes de Papanicolaou e colposcopia reduziu em mais de 75% as taxas de incidência e a mortalidade por câncer cervical nos últimos 50 anos, pois a progressão das NIC para o câncer invasivo, em geral é lenta (média de 20 anos) (Franco & Harper, 2005). Nos países em desenvolvimento, existem diversas dificuldades técnicas, econômicas e operacionais para implantar os programas de prevenção do câncer de útero, que requerem alto investimento e repetição periódica dos testes; sendo assim o câncer cervical constitui uma das principais causas de morte em mulheres, tornando essencial a busca de novas estratégias de prevenção (Franco & Harper, 2005).

A tecnologia de recombinação genética permitiu o desenvolvimento de vacinas profiláticas ou terapêuticas (Kahn & Bernstein, 2005). As vacinas profiláticas são altamente imunogênicas e evitam a infecção pelo HPV e as doenças a elas associadas e as terapêuticas induzem regressão das lesões pré-cancerosas e remissão do câncer invasivo (Franco & Harper, 2005; Kahn & Bernstein, 2005). As vacinas profiláticas contra o HPV são compostas pela proteína do capsídeo viral L1 do HPV que se auto-reproduz em partículas vírus-like (VLP) quando expressa em sistemas recombinantes, induzem forte resposta humoral com anticorpos neutralizadores (Villa, 2006). A injeção intamuscular da VLP resulta em resposta imune adaptativa eficaz para células T e B, que são capazes de neutralizar as infecções naturais subsequentes (Villa, 2006). Estudos de fase 1, 2 e 3 revelaram que a injeção intramuscular das VLP do HPV 6, 11, 16 e 18 são capazes de estimular a resposta de anticorpos muitas vezes superior à encontrada após a infecção natural e que o uso de vacinas formuladas com essas VLP mostrou-se seguro em animais e humanos (Brickers, 2007). O esquema de vacinação é de três doses, por via intamuscular, com intervalo de 2 e 6 meses e foi licenciada para o sexo feminino na faixa etária entre 9 e 26 anos (FDA, 2006; MERCK, 2006).

A vacina bivalente, que protege contra os HPV- 16 e HPV-18, e a quadrivalente, contra os tipos 6,11 16 e 18, têm demonstrado redução significativa da incidência de infecções persistentes pelo HPV. A vacina bivalente demonstrou eficácia de 91,6% contra infecção incidental e 100% contra as persistentes pelos HPV-16 e HPV-18. A vacina foi segura, bem tolerada e altamente imunogênica (Harper *et al.*, 2004; Franco & Harper, 2005; Weaver, 2006). A vacina

quadrivalente também conferiu 100% de eficiência mostrando-se segura e efetiva na prevenção de lesões pré-cancerígenas do colo do útero e verrugas genitais (Weaver, 2006). Durante pelo menos 3,5 anos nenhuma das 755 mulheres que receberam três doses da vacina quadrivalente apresentou NIC II ou III, enquanto 12 das 750 que receberam placebo tiveram lesão (eficácia de 100%) (Mao *et al.*, 2006). Entretanto, a duração da proteção ainda é desconhecida, os títulos de anticorpos um mês após a terceira dose foram 100 vezes superiores aos observados após a infecção natural e, apesar da queda, os títulos de anticorpos permaneceram altos por, pelo menos, 36 a 48 meses (Mao *et al.*, 2006). Os títulos de anticorpos contra o HPV-16 e HPV-18 se mantêm elevados por pelo menos 3,5 anos. Para os tipos 6 e 11 do HPV, os dados são de dois anos (FDA, 2006; MERCK, 2006; Mao *et al.*, 2006).

Doentes HIV-positivos bem como aqueles com outras causas de imunossupressão têm risco aumentado para câncer oral e anogenital associados ao HPV. A eficácia da vacina contra o HPV para reduzir a incidência desses tumores nos imunodeprimidos pode depender de vários fatores, incluindo os efeitos do imunocomprometimento na resposta à vacinação, se os doentes têm tipos virais não usados na vacina e se a imunização deva ocorrer antes que a depressão imunológica seja acentuada (Palefsky, 2006).

A vacina contra o HPV é promissora, porém diversas questões deverão ser avaliadas nos próximos estudos: Será necessário reforço? Qual a eficácia em longo prazo? Qual será o impacto sócio-econômico da vacina? A associação de outros sorotipos seria importante? Os homens devem ser vacinados? Sabe-se que apenas a vacina não será suficiente para resolver esse grande problema epidemiológico, sendo que o trabalho preventivo e a educação em saúde são fundamentais.

1.6 Mecanismos de potencialização da patogênese associada ao HPV em mulheres soropositivas para o HIV

O HIV-1 é um lentivírus que possui genes reguladores e estruturais. É constituído por dupla fita de RNA, coberta por uma camada lipoprotéica. O capsídeo, chamado de *core* viral é composto pelas proteínas p19, p24 e p55,

codificadas pelo gene *gag*. Um envelope glicoprotéico (gp41, gp120), codificado pelo gene *env*, e as enzimas transcriptase reversa (p66), protease (p55) e integrase (p31), codificadas pelo gene *pol* também estão presentes nas partículas virais. Como nos outros retrovírus, nas porções finais do genoma do HIV-1, podem ser observadas sequências terminais repetidas (LTR), que controlam a expressão dos outros genes do HIV. Além dessas proteínas estruturais, vários genes reguladores são observados, como *tat*, *ver* e *nef*, que controlam a replicação viral, quando ativados (Levy, 1995).

Vários mecanismos podem explicar o aumento da prevalência e o curso mais agressivo das doenças associadas ao HPV em indivíduos infectados pelo HIV. Estes incluem interações diretas entre os dois vírus, imunossupressão e instabilidade cromossomal. Estudos mostram a possibilidade do HIV influenciar diretamente a expressão dos genes do HPV, por interações moleculares entre os genes virais. A proteína transativadora do HIV-1, a *tat-1*, tem múltiplas funções regulatórias *in vitro*. A *tat-1* pode estimular o crescimento das células do sarcoma de Kaposi, inibir a proliferação celular *in vitro* e transativar vários promotores virais. De fato, a proteína reguladora do HIV (gene *tat-1*) pode interagir com a E2 do HPV 16, levando ao aumento da expressão dos genes E6 e E7 do HPV em pacientes co-infectados (Palefsky, 2006).

Demonstrou-se que a *tat-1* interage com a região regulatória (URR) do HPV 16 e reverte a repressão mediada por E2 levando a um aumento da expressão dos oncogenes E6 e E7 do HPV (Clark & Chetty, 2002). Isto proporciona um mecanismo potencial para explicar a expressão gênica intensificada do genoma do HPV em mulheres infectadas pelo HIV. Entretanto, não há evidências para a infecção persistente do epitélio oral ou anogenital, onde localiza-se o HPV e para a co-infecção dos queratinócitos infectados pelo HPV. Além disso, a co-infecção não é necessária por si só, uma vez que a proteína *tat* do HIV-1 pode ser secretada a partir de células infectadas pelo HIV e dessa forma ser introduzida em queratinócitos infectados pelo HPV, embora a proteína *tat* do HIV-1 nunca tenha sido demonstrada *in vivo*, no epitélio infectado pelo HPV (Palefsky, 2006). Por isso, é pouco provável que os dois vírus venham interagir diretamente, de uma forma sustentada que seria esperado para modificar o resultado da doença associada ao HPV.

A modulação da resposta imune ao HPV é o mecanismo mais provável pelo qual o HIV potencializa a doença associada ao HPV. Acredita-se que a resposta imune ao HPV desempenhe um papel crítico no controle da infecção pelo HPV em mulheres HIV positivas e HIV negativas. A maioria das mulheres tornou-se negativa ao HPV após os trinta anos de idade, como determinado pelos testes de detecção do HPV disponíveis atualmente, e somente uma pequena porcentagem de mulheres saudáveis é diagnosticada particularmente com lesão de alto grau ou câncer (Schiffman, 1992). Presumivelmente, isso ocorre devido a uma resposta imune celular efetiva ao HPV. Ao contrário, mulheres com história de transplante de órgãos têm uma incidência aumentada de câncer cervical e vulvar comparado a mulheres saudáveis, provavelmente devido à baixa imunidade associada à medicação usada para prevenir a rejeição ao enxerto (Penn, 1986; Penn, 1991).

A natureza precisa da resposta imune é pouco conhecida. Alguns estudos demonstram que as células T-citotóxicas específicas para os oncogenes E6 e E7 do HPV, podem ser importantes (Palefsky, 2006). Entretanto é claro que a resposta imune sistêmica ao HPV é relativamente fraca quando comparada à resposta sistêmica aos vírus, tais como o citomegalovírus. Isso provavelmente ocorre devido à compartimentalização natural da infecção pelo HPV, com a infecção ao HPV restrita às células do epitélio (Jacobson *et al.*, 2001; Komanduri *et al.*, 2001). Embora esse efeito aconteça nas células CD4+ e na regulação da resposta imune para uma variedade de antígenos, a infecção pelo HIV pode diminuir a resposta imune sistêmica ao HPV. Especula-se que se há um número reduzido de células de memória específicas ao HPV circulando, assim a imunidade específica ao HPV pode ficar vulnerável aos efeitos do HIV. Além disso, a imunidade específica para o HPV não pode ser recuperada integralmente após a restauração da resposta imune, o que pode explicar o efeito relativo da HAART nas lesões associadas ao HPV (Clark & Chetty, 2002; Palefsky, 2006).

A resposta imune local nos tecidos pode ser especialmente importante, porém, têm sido de difícil estudo. Levi *et al.* (2005) mostraram que o número de células de Langerhans está diminuído em mulheres HIV-positivas, com alta carga viral do HIV e apresentando neoplasia intra-epitelial cervical, comparado com mulheres HIV negativas. Kobayashi *et al.* (2004) demonstraram que na neoplasia

intra-epitelial cervical de mulheres HIV positivas, a imunidade celular (células T CD4+, macrófagos, neutrófilos e células natural Killer) e a expressão de interferon-gama estavam significativamente diminuídas, em comparação com a neoplasia intra-epitelial cervical de mulheres HIV negativas. A regulação da citocinas também estava diminuída em mulheres HIV positivas. A análise desses dados indica que ambas as respostas pró e anti-inflamatórias presentes em lesões de alto grau são reprimidas em mulheres infectadas pelo HIV (Kobayashi *et al.*, 2004; Palefsky, 2006).

A infecção pelo HIV também pode estar associada com alterações na produção das citocinas, que por sua vez podem modular a infecção pelo HPV nos tecidos. Níveis elevados de interleucinas na circulação, incluindo a IL-6, IL-1 e TNF alfa têm sido descritos na infecção pelo HIV e estas e outras citocinas têm sido implicadas na modulação da transcrição do HPV (Clark & Chetty, 2002; Palefsky, 2006).

Como descrito anteriormente, a resposta imune parece ter um papel importante na proteção contra a progressão das lesões de alto grau e o câncer invasivo. Entretanto, outros fatores que não os imunológicos, também devem ser operativos. Confirmam-se cada vez mais as evidências que sugerem que a progressão para o câncer possa refletir os danos genéticos ocorridos nas lesões precursoras. Os estudos *in vitro* com linhagens celulares cervicais indicam que as propriedades oncogênicas dos HPVs de alto risco podem ser atribuídas principalmente às proteínas E6 e E7 do HPV. Estas proteínas perturbam o mecanismo de reparo do DNA e o controle do ciclo celular através da interação com os genes supressores de tumor p53 e pRB, respectivamente (Duensing *et al.*, 2000). E6 e E7 têm demonstrado provocar instabilidade genômica em cultura celular (Duensing *et al.*, 2000; Duensing & Munger 2001), e desequilíbrio no número de cópias dos cromossomos, e essas alterações já tinham sido descritas anteriormente para ambos, o câncer cervical e o câncer anal (Heselmeyer *et al.*, 1997; Kirchhoff *et al.*, 1999; Hidalgo *et al.*, 2000; Skyldberg *et al.*, 2001).

2 JUSTIFICATIVAS

O presente estudo justificou-se pelas seguintes observações:

(1) As mulheres representam uma proporção crescente na epidemia da AIDS, sendo infectadas numa taxa muito maior do que os homens e representando agora metade da população infectada;

(2) O HIV altera a história natural da infecção pelo HPV, com taxas de regressão diminuídas e progressão para lesões de alto grau e lesões invasivas, refratárias ao tratamento, necessitando de uma maior intervenção e monitoramento;

(3) Vários estudos documentam uma alta prevalência de co-infecção com o HPV nas pacientes positivas para o HIV;

(4) O estabelecimento de estratégias adequadas para a prevenção e o tratamento de pacientes requer o conhecimento prévio da epidemiologia e da patogênese da infecção pelo HPV na população de mulheres infectadas pelo HIV;

(5) Até o momento, nenhum estudo molecular para a identificação dos genótipos 16 e 18 do HPV, em amostras cervicais de pacientes HIV positivas, foi desenvolvido em Goiânia;

(6) O diagnóstico molecular do HPV, utilizando a técnica de PCR, com *primers* GP5+/GP6+ é um método de detecção altamente sensível e específico, justificando assim sua utilização na identificação do DNA do HPV, nas amostras cervicais;

(7) Estudos demonstram a presença de múltiplos genótipos do HPV em pacientes HIV positivas, sendo que em várias delas, as lesões precursoras evoluíram para neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC), justificando assim a necessidade de detecção dos genótipos virais nestas pacientes;

(8) A associação entre o câncer cervical e o HPV é bem conhecida, mas a associação entre o tipo de HPV e grau de lesões intraepiteliais escamosas em pacientes HIV positivas é ainda incerta.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Comparar a prevalência das infecções pelo HPV-16 e HPV-18 e seus possíveis fatores de risco em um grupo de mulheres HIV-positivas e HIV-negativas, da cidade de Goiânia-GO e determinar os aspectos epidemiológicos e comportamentais de ambos os grupos de mulheres.

3.2 Objetivos específicos

(1) Determinar a prevalência de alterações citológicas cervicais nos dois grupos de mulheres;

(2) Determinar a prevalência do genoma do HPV em amostras cervicais, obtidas dos dois grupos de mulheres, utilizando os primers GP5+/GP6+ e a metodologia de PCR;

(3) Comparar a distribuição dos tipos 16 e 18 do HPV em mulheres HIV positivas e HIV negativas;

(4) Comparar os resultados das alterações citológicas cervicais com a presença do genoma viral.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho do estudo

O trabalho consistiu de um estudo prospectivo comparativo do tipo caso-controle. Mulheres soropositivas (caso: HIV-positivas) e mulheres soronegativas (controle: HIV-negativas) para o HIV foram comparadas com relação aos dados sócio-demográficos, hábitos sexuais, análise das alterações citológicas, detecção e genotipagem do HPV. Possíveis associações entre esses parâmetros também foram investigadas neste estudo.

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

O estudo foi realizado após apreciação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Católica de Goiás e da Santa Casa de Misericórdia de Goiânia.

4.3 Seleção de sujeitos

O estudo envolveu uma população de 60 mulheres soropositivas para o HIV, assistidas pelo CADA (Centro de Apoio ao Doente com AIDS) e 60 mulheres soronegativas para o HIV, selecionadas durante a Semana de Cultura e Cidadania da Universidade Católica de Goiás realizada em junho de 2007. Todas as pacientes foram esclarecidas quanto aos objetivos do projeto e quanto à coleta de material biológico. Após serem informadas e concordarem em participar do estudo, as pacientes incluídas assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1). As mulheres que atenderam ao convite foram encaminhadas para uma entrevista individual com o pesquisador, na qual responderam um questionário (Anexo 2). Posteriormente, essas pacientes foram submetidas ao exame ginecológico dos genitais externos e à coleta de material cérvico-vaginal pelos ginecologistas colaboradores do estudo, para exame citológico e detecção do genoma viral.

4.4 Coleta de espécimes cervico-vaginais

No Laboratório da Área da Saúde (LAS) da Universidade Católica de Goiás e no CADA, em Goiânia, as mulheres soronegativas e as soropositivas para o HIV, respectivamente, foram submetidas ao exame clínico cuidadoso, com inspeção dos genitais externos e da região perianal. A seguir, com uma espátula de Ayre foi coletado material de fundo de saco vaginal e da ectocérvice. Utilizando uma escova de *cytobrush*, com um diâmetro 5 a 8 mm, foi coletado material da endocérvice (com seis movimentos rotatórios) para exame citopatológico, realizado pelo método convencional e detecção de HPV. Após a confecção das lâminas, as escovas eram mergulhadas em uma solução-tampão preservadora UCM - Universal Collection Medium (*Digene Corporation*) para posterior pesquisa de DNA de HPV e genotipagem, pelo método de PCR. Quando indicados, exames colposcópicos com ácido acético a 3% e biópsia do colo do útero foram realizados. O exame citopatológico negativo ou exibindo anormalidades em células epiteliais escamosas e glandulares (incluindo lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau LSIL, lesão intra-epitelial escamosa de alto grau, HSIL, células glandulares atípicas - provável lesão de alto grau; adenocarcinoma *in situ*, carcinoma escamoso invasor e adenocarcinoma invasor) foi categorizado de acordo com os critérios morfológicos já definidos (Solomon & Nayar, 2004). Os exames citopatológicos foram realizados no Laboratório Rômulo Rocha, da Universidade Federal de Goiás, sob supervisão da Dra. Sílvia Helena Rabelo Santos, colaboradora do projeto. Não foi possível o acesso aos dados de carga viral do HIV e de contagens de linfócitos TCD4+.

4.5 Diagnósticos moleculares

A implementação e padronização das técnicas moleculares foram desenvolvidas no Laboratório Replicon e Laboratório de Diversidade Genética da Universidade Católica de Goiás. Os espécimes cervico-vaginais colhidos em solução tampão foram submetidos à extração de DNA. A qualidade do DNA extraído foi testada por meio da amplificação de um segmento de 90 pb do gene gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH), um gene constitutivo que

codifica uma enzima da via glicolítica. O produto purificado de cada amostra foi testado para a presença de HPV por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se os *primers* genéricos GP5+/GP6+. Esses *primers* amplificam um pequeno fragmento do genoma viral correspondente à região L1 com 139-148 pares de bases, permitindo a detecção de vários tipos de HPVs. (Gravitt *et al.*, 2000). Os casos negativos para a detecção de HPV foram testados, por até três vezes. Uma vez constatada a presença do genoma viral, novas reações de PCR foram feitas para cada amostra, utilizando *primers* específicos para a região E6 do HPV-16, que amplificam um fragmento com 120 pares de bases e *primers* específicos para a região E6 do HPV-18, que amplificam um fragmento com aproximadamente 175 pares de bases. As seqüências dos *primers* utilizados para a amplificação do gene GAPDH encontram-se descritas na tabela 2.

4.5.1 Extração de DNA

A extração do DNA do HPV das amostras coletadas foi feita com a utilização do kit comercial *Wizard DNA Isolation Kit* (Promega), utilizando o protocolo descrito abaixo.

4.5.1.1 Preparo das amostras

Todas as escovas contidas nos tubos com solução-tampão preservadora foram previamente agitadas, sendo posteriormente centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos, para que as células formassem um pellet. Com uma micropipeta foram aspirados cerca de 100 µl do sedimento de cada amostra e transferidos para um microtubo previamente identificado, para posterior lise celular. As etapas seguintes foram aplicadas a todas as amostras.

4.5.1.2 Lise celular

Cerca de 100 µl de solução de lise celular foram adicionados a cada microtubo contendo 100 µl da amostra e o tubo foi homogeneizado com uma pipeta por 30 a 50 vezes. O lisado celular foi incubado a 65°C por 15 minutos,

sendo posteriormente adicionados 5 μ l da solução de Proteinase K (20mg/U). Os tubos foram homogeneizados 25 vezes por inversão e incubados a 55°C por uma hora, com inversões periódicas. Posteriormente, foi observado se houve lise celular em cada um dos tubos.

4.5.1.3 Tratamento com RNase

Confirmada a lise celular, foram adicionados 0,5 μ l da solução de RNase ao lisado, e este foi homogeneizado 25 vezes por inversão e incubado a 37°C por 15 minutos.

4.5.1.4 Precipitação de proteínas

Cerca de 33 μ l da solução de precipitação de proteínas foram adicionados ao lisado, e os tubos foram vigorosamente agitados no vórtex em alta velocidade por 20 segundos. A amostra foi então colocada no freezer por 15 minutos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 3 minutos. As proteínas precipitadas formaram um *pellet*. Caso o *pellet* não fosse visível, o tubo era agitado novamente no vórtex em alta velocidade por 20 segundos e colocado novamente no freezer seguindo os passos citados anteriormente.

4.5.1.5 Precipitação do DNA

O sobrenadante contendo o DNA (deixar o *pellet* no tubo) foi transferido para outro microtubo de 1,5 ml, previamente identificado, no qual, adicionou-se 100 μ l de isopropanol 100% gelado. Os tubos foram gentilmente homogeneizados 50 vezes por inversão e centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos. Após a precipitação, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram invertidos sobre papel absorvente. Os *pellets* contendo o DNA foram lavados com 100 μ l de etanol 70%, e os tubos homogeneizados 25 vezes por inversão. Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi cuidadosamente descartado. Os tubos foram invertidos sobre um papel

absorvente e o *pellet* correspondente a cada amostra foi seco à temperatura ambiente.

4.5.1.6 Hidratação do DNA

O *pellet* correspondente a cada amostra foi ressuspenso em 20 µl da solução de hidratação e deixado *overnight* à temperatura ambiente. O DNA resultante foi armazenado em freezer -20°C até a realização dos ensaios de PCR.

4.5.2 Amplificação do gene GAPDH usado como controle da qualidade do DNA purificado

As amostras de DNA foram submetidas à reação de PCR, utilizando-se os *primers* específicos para a amplificação do gene GAPDH (gene constitutivo humano), que amplificam um fragmento de aproximadamente 90 pb (pares de base). A amplificação do GAPDH é necessária para assegurar a qualidade do DNA extraído e a ausência de inibidores inespecíficos da reação de PCR. Para não haver contaminação da PCR, esta foi realizada em câmara de fluxo previamente limpa com álcool a 70% e irradiada com luz ultra-violeta por 30 minutos. Todos os reagentes da PCR foram rapidamente centrifugados e homogeneizados no vórtex, sendo previamente descongelados sobre o gelo picado. Um controle negativo da reação contendo todos os componentes, exceto o DNA, foi incluído em todas as amplificações. Como controle positivo utilizou-se DNA humano extraído do sangue. O protocolo para PCR de GAPDH com todos os reagentes encontra-se descrito no Anexo 3. As amplificações foram realizadas em termociclador e as sequências dos primers e as condições da PCR estão descritas na tabela 2. Os produtos obtidos pelas reações de PCR foram analisados em gel de poliacrilamida a 8% e corados com nitrato de prata (Anexo 5).

TABELA 2. Descrição dos *primers* e protocolos de ciclagem usados no ensaio de PCR para a amplificação do gene GAPDH em amostras cervicais.

Fragmento Amplificado/Primers	Condições de ciclagem
($\cong 90$ bp)	94°C - 5 min
	94°C - 30 s
Primer P1 (f) : 5' - TGGACTCCACGACGTAAGTCTCAG - 3'	59°C - 1 min
Primer P2 (f) : 5' - TTGTCATCAATGGAAATCCCATCA - 3'	72°C - 1 min
	72°C - 7 min
	4°C - ∞

} 35 ciclos

4.5.3 Detecção do genoma viral utilizando os primers genéricos GP5+/GP6+ e genotipagem do HPV-16 e HPV-18 utilizando primers tipo-específicos

Para detecção do genoma do HPV, foi utilizada a técnica convencional de PCR com *primers* consensuais GP5+ e GP6+. Todas as amostras negativas para a presença do HPV foram testadas três vezes. As amostras que foram positivas também foram testadas três vezes para a confirmação da detecção do HPV. Como descrito anteriormente, todos os reagentes da PCR foram rapidamente centrifugados e homogeneizados no vórtex, sendo previamente descongelados sobre o gelo picado. Um controle negativo da reação contendo todos os componentes, exceto o DNA, foi incluído em todas as amplificações. Como controle positivo utilizou-se uma amostra positiva para detecção do HPV, previamente testada.

As reações de PCR mediadas por GP5+/GP6+ foram realizadas num volume final de 25 μ l, utilizando um termociclador (PE 2400, Perkin Elmer), em mistura contendo 2,0 mM MgCl₂, 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 250 μ M de cada desoxinucleotídeo-trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, e dTTP), 50 pmol de cada *primer* (GP5+ ou GP6+) e 100 ng de DNA em tampão 1 vez concentrado (Taq DNA Polimerase Buffer - Phoneutria). O protocolo para PCR de GP5+/GP6+ com todos os reagentes encontra-se descrito no Anexo 3. As sequências dos *primers*, o tamanho dos amplicons e as condições de ciclagem usadas na PCR encontram-se descritas na tabela 3.

As reações de PCR usadas para identificação de HPV-16 e -18 também foram realizadas num volume final de 25 μ l, contendo uma mistura de 1,5

mM MgCl₂, 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 200 μM de cada desoxinucleotídeo-trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, e dTTP), 0,25 μM de cada *primer* (p1:*sense* e p2: *antisense*) e 100 ng de DNA em tampão 1 vez concentrado (Taq DNA Polimerase Buffer - Invitrogen). Todas as amostras negativas para a presença do HPV foram testadas três vezes. As amostras que foram positivas também foram testadas três vezes para a confirmação do tipo 16 e 18 do HPV. Um controle negativo da reação contendo todos os componentes, exceto o DNA, foi incluído em todas as amplificações. Como controle positivo utilizou-se uma amostra de carcinoma escamoso cervical, positiva para o HPV-16 e outra positiva para o HPV-18, ambas previamente testadas. Os protocolos para PCR de HPV-16 e HPV-18 com todos os reagentes encontram-se descritos no Anexo 4. As sequências dos *primers*, o tamanho dos amplicons e as condições de ciclagem usadas na PCR encontram-se descritas na tabela 3. Os produtos obtidos pelas reações de PCR foram analisados em gel de poliacrilamida a 8% e corados com nitrato de prata (Anexo 5).

TABELA 3. Descrição dos *primers*, tamanho dos *amplicons* e protocolos de ciclagem usados no ensaio de PCR para detecção de HPV-16 e HPV-18 em amostras cervicais.

Fragmento Amplificado/Primers	Condições de ciclagem
Região L1 (139-148 bp) - Vários HPVs de alto risco Primer GP5+ : 5' - TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC - 3' Primer GP6+ : 5' - CTTATACTAAATGTCAAATAAAAAG - 3'	94°C - 4 min 94°C - 1 min 40°C - 2 min 72°C - 1 min 72°C - 7 min 4°C - ∞ } 40 ciclos
Região E6 (≅175 bp) - HPV-18 P1 : 5' - CCGAGCACGACAGGAACGACT - 3' P2 : 5' - TCGTTTTCTTCCTCTGAGTCGCTT - 3'	94°C - 5 min 94°C - 1 min 50 °C - 1 min 72°C - 1 min 72°C - 7 min 4°C - ∞ } 35 ciclos
Região E6 (≅120 bp) - HPV-16 P1 : 5' - TCAAAAGCCACTGTGTCCTGA - 3' P2 : 5' - CGTGTTCTTGATGATCTGCAA - 3'	95°C - 5 min 95°C - 30 s 62°C - 1 min 72°C - 1 min 72°C - 7 min 4°C - ∞ } 40 ciclos

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Um banco de dados foi criado, utilizando o programa *Microsoft Excel* 2002, contendo todos os dados sócio-demográficos, comportamentais e clínico-patológicos das mulheres avaliadas neste estudo. A estatística descritiva com suas respectivas frequências foi realizada para as variáveis relativas às características sócio-demográficas, comportamentais e clínico-patológicas das amostras obtidas. O teste do *qui-quadrado* com correção de Yates, nível de significância de 5% e intervalo de confiança de 95% foi usado para avaliar as possíveis diferenças entre os aspectos sócio-demográficos, comportamentais e clínico-patológicos, no grupo de mulheres HIV-positivas e mulheres HIV-negativas. Para investigar as possíveis associações entre os fatores selecionados e a infecção por HPV realizou-se análise univariada, pelo teste de *qui-quadrado*, com nível de significância de 5% e correção de Yates.

6 RESULTADOS

A amplificação do gene constitutivo GAPDH foi positiva em 114 das 120 amostras testadas por PCR, incluindo 57 mulheres HIV-positivas e 57 mulheres HIV-negativas. O estudo analisou as características sócio-demográficas, comportamentais e clínico-patológicas de 114 mulheres, sendo 57 delas HIV-positivas e 57 HIV-negativas. A Figura 9 mostra os resultados dos produtos de PCR analisados em gel de poliacrilamida 8%, obtidos com a utilização de *primers* específicos para o gene GAPDH.

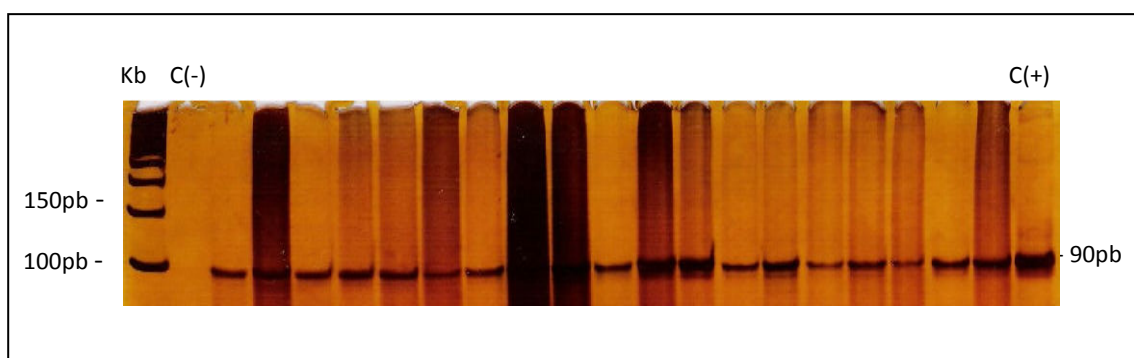


Figura 9: Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata, mostrando os produtos de PCR obtidos com a utilização de *primers* específicos para o gene GAPDH. Bandas de aproximadamente 90 pares de bases demonstram a presença de DNA.

6.1 Caracterização da amostra

As características sócio-demográficas e comportamentais da população amostral estão descritas na Tabela 4. A idade do grupo variou de 18 a 68 anos e a média de idade das pacientes no estudo foi de 38 anos. Ao analisar os aspectos sócio-demográficos, como o estado civil, a renda familiar e a escolaridade da população amostral, verificou-se que 43,9% das mulheres eram solteiras e 31,6% eram casadas; 69,3% das mulheres recebiam menos que um salário mínimo e 50,9% destas não concluíram o ensino fundamental. Com relação às características comportamentais, a média de idade da primeira relação sexual foi aos 17 anos, variando de 12 a 31 anos; 51,75% das mulheres tiveram de 1 a 3 parceiros sexuais durante sua vida e 9,65% tinham história de prostituição.

Tabela 4: Análise descritiva das características sócio-demográficas e comportamentais do grupo estudado.

Variável	N	%
Idade (anos)	38(18 - 68)	
Estado Civil		
Solteira	50	43,9
Casada	36	31,6
Outros	28	24,6
Renda Familiar		
menor que 1 salário	79	69,3
1 a 3 salários	30	26,3
acima de 3 salários	5	4,4
Escolaridade		
Ensino fundamental incompleto	58	50,9
Ensino fundamental completo	11	9,6
Ensino médio completo ou acima	45	39,5
não informado	0	0,0
Paridade	2 (0 - 10)	
Idade da 1ª relação sexual	17 (12 - 31)	
N. de parceiros sexuais		
1 a 3	59	51,75
4 a 10	42	36,84
mais de 10	13	11,40
Historia de prostituição		
Sim	11	9,65
Não	103	90,35
Tabagismo		
Sim	29	25,44
Não	85	74,56
Etilismo		
Sim	33	28,95
Não	81	71,05

A Tabela 5 mostra a descrição das características clínico-patológicas das amostras cervicais analisadas neste estudo. A avaliação colpocitológica mostrou que de um total de 114 mulheres, 94 (83,4%) apresentaram citologia normal e que 13 (10,8%) apresentaram lesões precursoras do câncer cervical (NIC I, NIC II/NICIII). Dentre as amostras cervicais das mulheres analisadas, 42 (36,8%) apresentaram o genoma do HPV detectado pela técnica de PCR. O HPV-16 foi o tipo mais prevalente, sendo detectado em 40 mulheres, correspondendo a 35,1% dos casos estudados, enquanto o HPV-18 foi detectado em 18 mulheres (15,8%). A associação dos dois genótipos (HPV-16 e HPV-18) foi detectada em 15,8% das mulheres.

Tabela 5: Análise descritiva das características clínico-patológicas das amostras cervicais estudadas.

Variável	N	%
Citologia		
Normal	94	84,2
ASCUS	7	5,8
NIC I	6	5
NIC II/III	7	5,8
Detecção de HPV		
Positivo	42	36,8
Negativo	72	63,2
Genotipagem		
HPV 16	40	35,1
HPV 18	18	15,8
HPV 16 e HPV18	18	15,8

6.2 Diferenças entre as características sócio-demográficas e comportamentais dos dois grupos estudados

As características sócio-demográficas e comportamentais das pacientes estudadas são mostradas na Tabela 6. Os dois grupos se mostraram bastantes semelhantes com relação a algumas características, porém, diferenças significativas foram observadas entre eles. A média de idade das mulheres HIV-positivas foi de 35 anos, enquanto que a média para as mulheres HIV negativas foi de 39 anos. As diferenças entre as médias de idade não foram significativas.

Dentre as variáveis sócio-demográficas, foram observadas diferenças significativas entre o estado civil ($p < 0,05$) das pacientes, sendo que as solteiras perfaziam 66% do grupo de HIV-positivas, comparadas a 34% das HIV-negativas. O estado civil “casada” foi considerado um fator de proteção com relação à infecção pelo HIV ($p < 0,05$) [OR= 0,328; IC 95% (0,135-0,798)], pois 61,1% das mulheres casadas eram HIV-negativas, enquanto 38,9% eram HIV-positivas.

A renda familiar foi outro aspecto divergente entre os grupos estudados, sendo que 63,3% das mulheres que ganhavam menos que um salário mínimo eram HIV-positivas, enquanto que 76,7% das mulheres que ganhavam de um a três salários mínimos eram HIV-negativas ($p < 0,05$). Com relação à escolaridade, 65,5% das mulheres que não completaram o ensino fundamental eram HIV-positivas, comparadas a 34,5% das HIV negativas. Por outro lado,

68,9% das mulheres que completaram o ensino médio eram HIV- negativas comparadas a 31,1% no grupo HIV-positivo ($p < 0,05$).

Quanto aos hábitos sexuais, diferenças significativas foram observadas entre os grupos com relação à história de prostituição, sendo que 90,9 % das mulheres que relataram história de prostituição eram HIV-positivas ($p < 0,05$). Esta observação demonstra que a prostituição aumentou onze vezes o risco de infecção pelo HIV, comparadas às mulheres que não apresentaram histórico de prostituição [OR=11,915; IC 95% (1,471-96,512)].

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

Com relação à idade à primeira relação sexual, a média de idade no grupo de mulheres HIV-positivas foi de 16 anos, variando de 12 a 22 anos, enquanto que no grupo de mulheres HIV negativas, a média foi de 18 anos, variando de 13 a 31 anos. Uma diferença significativa foi observada entre os dois grupos ($p < 0,05$). O tabagismo foi outra característica comportamental que apresentou diferença significativa entre os dois grupos ($p < 0,05$). Dentre as mulheres que fumavam, 69% eram HIV-positivas [OR=2,883; IC 95% (1,177-7,062)]. O consumo de álcool não mostrou diferença significativa entre os dois grupos estudados.

Tabela 6: Análise univariada das características sócio-demográficas e comportamentais avaliadas para os dois grupos estudados.

Variável	Grupos				P	**IC 95%
	HIV negativo		HIV positivo			
	N	%	N	%		
Idade (anos)	39 (18 - 68)		35 (19-63)		0,111	
Estado Civil						
Solteira	17	34	33	66		1
Casada	22	61,1	14	38,9	0,013 *	0,328 (0,135 - 0,798)
Outros	18	64,3	10	35,7	0,01*	0,286 (0,109 - 0,755)
Renda Familiar						
menor que 1 salário	29	36,7	50	63,3		1
1 a 3 salários	23	76,7	7	23,3	<0,001*	0,205 (0,084 - 0,497)
acima de 3 salários	5	100	0	-	-	-
Escolaridade						
Ensino fundamental incompleto	20	34,5	38	65,5		1
Ensino fundamental completo	6	54,5	5	45,5	0,208	0,439 (0,119 - 1,617)
Ensino médio ou acima	31	68,9	14	31,1	0,001*	0,238 (0,103 - 0,546)
Paridade	2 (0-10)		2,5 (0-7)		0,091	
Idade da 1ª relação sexual	18 (13-31)		16 (12-22)		<0,001*	
N. de parceiros sexuais						
1 a 3	37	62,7	22	37,3		1
4 a 10	18	42,9	24	57,1	0,048*	2,242 (1,000 - 5,028)
mais de 10	2	15,4	11	84,6	0,005*	9,250 (1,874 - 45,649)
Historia de prostituição						
Não	56	54,4	47	45,6		1
Sim	1	9,1	10	90,9	0,004*	11,915 (1,471 - 96,512)
Tabagismo						
Não	48	56,5	37	43,5		1
Sim	9	31	20	69	0,018*	2,883 (1,177 - 7,062)
Etilismo						
Não	41	50,6	40	49,4		1
Sim	16	48,5	17	51,5	0,836	1,089 (0,485 - 2,448)

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

**IC: intervalo de confiança

6.3 Características clínico-patológicas dos grupos estudados

A tabela 7 descreve os aspectos clínico-patológicos avaliados para as amostras cervicais obtidas dos dois grupos de mulheres analisadas neste estudo. A citologia oncótica apresentou-se normal em 57,4% das mulheres HIV-negativas e em 42,6% das mulheres HIV-positivas. Dentre as mulheres que apresentaram

lesão de baixo grau (NIC I), 100% eram HIV-positivas e dentre as que apresentaram lesão de alto grau (NIC II/NIC III), 85,7% eram HIV-positivas.

A detecção do genoma do HPV pelo método de PCR apresentou diferença significativa entre os grupos estudados. A detecção do HPV foi mais prevalente no grupo de mulheres HIV-positivas. O DNA do HPV foi detectado em 64,3% das mulheres HIV-positivas e em 35,7% das mulheres HIV-negativas ($p < 0,05$) [OR = 2,5; IC 95% (1,148-5,531)], ou seja, a infecção pelo HIV está associada a um risco 2,5 vezes maior de infecção pelo HPV. A Figura 10 mostra os resultados dos produtos de PCR analisados em gel de poliacrilamida 8%, obtidos com a utilização dos *primers* genéricos GP5+/GP6+ para detecção do HPV.

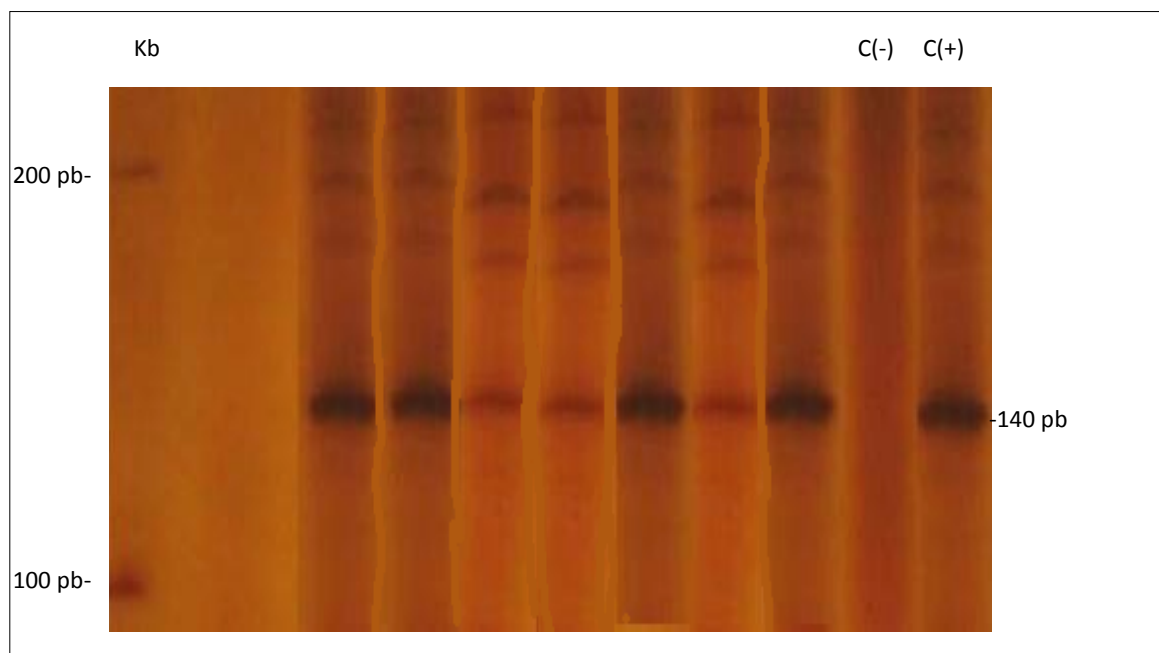


Figura 10: Amplificação por PCR da região L1 do genoma do HPV, utilizando os *primers* genéricos GP5+/GP6+. Bandas de aproximadamente 140 pares de bases demonstram a presença do genoma viral nas amostras.

A genotipagem do HPV foi realizada utilizando *primers* específicos para o HPV-16 e o HPV-18 e uma diferença significativa foi observada entre os grupos de mulheres estudadas. As Figuras 11 e 12 mostram os resultados dos produtos de PCR analisados em gel de poliacrilamida 8%, obtidos com a utilização dos *primers* específicos para o HPV-16 e HPV-18, respectivamente. Dentre as 57

amostras cervicais obtidas de mulheres HIV-positivas, 27 apresentaram o genoma do HPV e em todas elas foi detectado o HPV-16. O HPV-16 foi o tipo mais prevalente, tanto no grupo de mulheres HIV-negativas, como no grupo de mulheres HIV-positivas. A detecção do genoma do HPV-16 foi positiva em 67,5% das amostras obtidas de mulheres HIV-positivas e 32,5% das amostras obtidas das mulheres HIV-negativas ($p < 0,05$) [OR = 3,046; IC 95% (1,358-6,835)]. O HPV-18 também foi o mais prevalente no grupo de mulheres HIV-positivas, perfazendo 72,2% dos casos, comparados a 27,8% no grupo de mulheres HIV-negativas ($p < 0,05$) [OR = 3,073; IC 95% (1,016-9,294)]. Salienta-se ainda que, em todas as amostras em que foi detectado o HPV-18 encontrou-se simultaneamente o HPV-16.

Tabela 7: Análise univariada segundo as características clínico-patológicas dos grupos estudados

Variável	Grupos				p	**IC 95%
	HIV negativo		HIV positivo			
	N	%	N	%		
Citologia						
Normal	54	57,4	40	42,6		1
ASCUS	2	28,6	5	71,4	0,276	3,375 (0,623 - 18,291)
NIC I	0	0	6	100	-	-
NIC II/III	1	14,3	6	85,7	0,069	8,100 (0,938 - 69,965)
Deteção de HPV						
Negativo	42	58,3	30	41,7		1
Positivo	15	35,7	27	64,3	0,02*	2,520 (1,148 - 5,531)
Genotipagem						
HPV 16						
Negativo	44	59,5	30	40,5		1
Positivo	13	32,5	27	67,5	0,006*	3,046 (1,358 - 6,835)
HPV 18						
Negativo	52	54,2	44	45,8		1
Positivo	5	27,8	13	72,2	0,04*	3,073 (1,016 - 9,294)
HPV-16 e HPV-18						
Negativo	52	54,2	44	45,8		1
Positivo	5	27,8	13	72,2	0,04*	3,073 (1,016 - 9,294)

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

**IC: intervalo de confiança

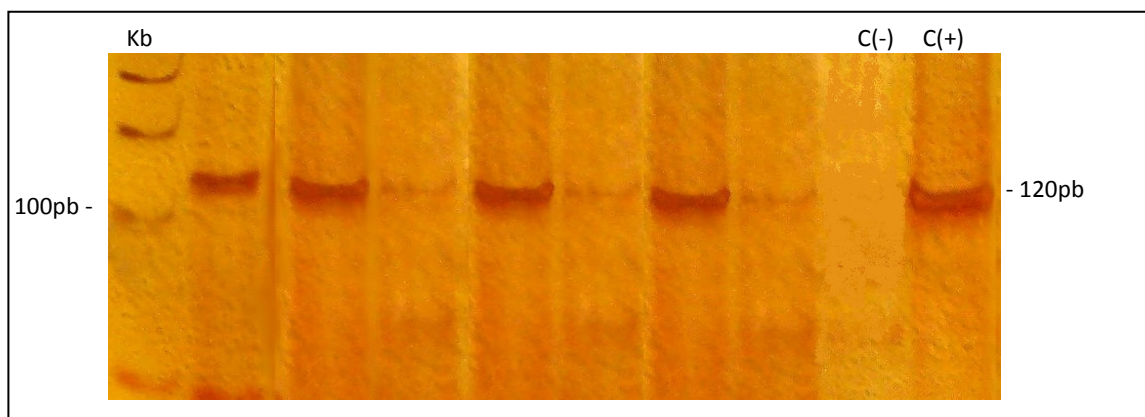


Figura 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata, mostrando produtos de amplificação com cerca de 120 pares de bases obtidos por ensaios de PCR com a utilização de *primers* específicos para a região E6 do HPV-16.

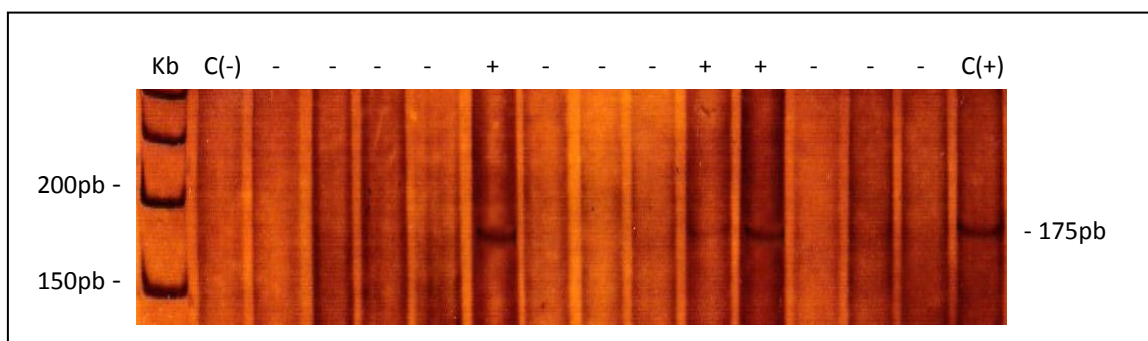


Figura 12: Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata, mostrando produtos de amplificação com cerca de, 175 pares de bases obtidos por ensaios de PCR com a utilização de *primers* específicos para a região E6 do HPV-18.

6.4 Associações entre a detecção do genoma do HPV e as características clínico-patológicas e comportamentais das mulheres estudadas

Os resultados das possíveis associações entre a detecção do genoma do HPV e as características clínico-patológicas e comportamentais das mulheres avaliadas neste estudo encontram-se descritas na tabela 8 para as mulheres HIV-negativas e na tabela 9 para as HIV-positivas. No grupo de mulheres HIV-negativas, nenhuma associação estatisticamente significativa foi observada em relação a essas características. Cerca de, 76% das mulheres com exame citológico normal, apresentaram resultados negativos para a detecção de HPV enquanto

que 24% apresentaram o genoma viral nas células cervicais, porém sem nenhuma alteração citológica microscopicamente visível. Apenas uma das 57 mulheres HIV-negativas apresentou lesão intra-epitelial cervical de alto grau (NIC II/NIC III) ao exame citológico convencional e nesta amostra, o genoma do HPV-16 foi detectado. No grupo de mulheres HIV-negativas, nenhuma apresentou lesão intra-epitelial de baixo grau e das duas pacientes que apresentaram ASCUS, apenas uma apresentou resultado positivo para detecção de HPV.

No grupo de mulheres HIV-negativas, observou-se que as mulheres que iniciaram a atividade sexual depois dos 18 anos, apresentaram uma maior prevalência do HPV (30,4%) comparadas às mulheres que iniciaram a atividade com menos de 18 anos (23,5%). Porém essa diferença não foi significativa. Nesse grupo de mulheres, aquelas que tiveram de 1 a 3 parceiros sexuais apresentaram maior prevalência do HPV (29,7%) quando comparadas às mulheres que tiveram de 4 a 10 parceiros (22,2%). De todas as mulheres HIV-negativas, apenas uma relatou ter história de prostituição e nessa o genoma do HPV foi detectado.

Tabela 8 – Detecção de HPV em relação às características clinico-patológicas e comportamentais em pacientes HIV negativas

Variável	Detecção do HPV				p	**IC 95%
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%		
Citologia						
Normal	41	75,9	13	24,1		1
ASCUS	1	50	1	50	0,406	3,154 (0,148 - 54,042)
NIC I	0	0	0	0	-	-
NIC II/III	0	0	1	100	0,084	-
idade na 1ª relação sexual						
≤ 18	26	76,5	8	23,5		1
> 18	16	69,6	7	30,4	0,561	0,703 (0,214 - 2,312)
N. de parceiros sexuais						
1 a 3	26	70,3	11	29,7		1
4 a 10	14	77,8	4	22,2	0,557	0,675 (0,181 - 2,518)
mais de 10	2	100	0	0	0,363	-
História de prostituição						
Não	42	75	14	25		1
Sim	0	9,1	1	90,9	0,091	-

**IC: intervalo de confiança

A Tabela 9 apresenta os resultados da detecção do HPV de acordo com as variáveis clínico-patológicas e comportamentais para o grupo de mulheres HIV-positivas. Dentre as 57 mulheres HIV-positivas, 40 apresentaram citologia normal, 5 apresentaram ASCUS, 6 apresentaram NIC I e 6 apresentaram NIC II/NIC III. O genoma do HPV foi encontrado em 37,5% das mulheres que apresentaram exame citológico normal. Nas mulheres com ASCUS e NIC I, a detecção do genoma do HPV foi positiva em, respectivamente, 40% e 66,7% das amostras cervicais.

No grupo de mulheres HIV-positivas uma associação estatisticamente significativa foi observada entre a detecção do genoma do HPV e a presença de lesões intra-epiteliais de alto grau (NIC II/NIC III), ou seja, todas as mulheres HIV-positivas que apresentaram lesões intra-epiteliais de alto grau, apresentaram também resultados positivos para a detecção do genoma do HPV nas amostras cervicais. ($p < 0,05$) [OR = 3,333; IC 95% (0,543-20,451)].

Com relação à idade à primeira relação sexual, observou-se que as mulheres que iniciaram a atividade sexual acima dos 16 anos apresentaram uma maior prevalência de infecção pelo HPV (57,1%), comparadas às mulheres que iniciaram a atividade com ou menos de 16 anos (41,7%), porém essa diferença não foi estatisticamente significativa. Nesse grupo de mulheres, aquelas que tiveram de 1 a 3 parceiros sexuais apresentaram uma maior prevalência do HPV (59,1%), quando comparadas às mulheres que tiveram de 4 a 10 parceiros (45,8%), ou mais de 10 parceiros sexuais (27,3%), porém nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada. Das 57 mulheres HIV-positivas, 10 relataram ter história de prostituição e nessas o genoma do HPV foi detectado em 5 casos (50%).

Tabela 9: Detecção de HPV em relação às características clínico-patológicas e comportamentais em pacientes HIV positivas.

Variável	Detecção do HPV				p	**IC 95%
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%		
Citologia						
Normal	25	62,5	15	37,5		1
ASCUS	3	60	2	40	0,913	3,333 (0,543 - 20,451)
NIC I	2	33,3	4	66,7	0,176	-
NIC II/III	0	0	6	100	0,004*	-
idade na 1ª relação sexual						
≤ 16	21	58,3	15	41,7		1
> 16	9	42,9	21	57,1	0,259	0,536 (0,180 - 1,592)
N. de parceiros sexuais						
1 a 3	9	40,9	13	59,1		1
4 a 10	13	54,2	11	45,8	0,369	0,586 (0,182 - 1,886)
mais de 10	8	72,7	3	27,3	0,085	0,563 (0,303 - 1,045)
Historia de prostituição						
Não	25	53,2	22	46,8		1
Sim	5	50	5	50	0,854	1,136 (0,290 - 4,452)

* Resultados com associação significativa entre a detecção do HPV as características analisadas

**IC: intervalo de confiança

7 DISCUSSÃO

Evidências demonstrando o papel do HPV como o agente etiológico para o câncer cervical vem sendo apresentadas há cerca de duas décadas. Vários estudos epidemiológicos, clínico-patológicos e moleculares se seguiram confirmando o papel do HPV na patogênese do câncer cervical e em suas lesões precursoras (Munoz *et al.*, 1992; Schiffman *et al.*, 1993; Kjaer *et al.*, 1996; Holoway *et al.*, 1999; Walboomers, 1999; zur Hausen, 2000; Martin *et al.*, 2006).

Embora, somente uma pequena fração de mulheres imunocompetentes com infecção pelo HPV desenvolvam anormalidades citológicas, mulheres imunocomprometidas infectadas pelo HPV são mais suscetíveis a essas anormalidades, apresentando uma frequência muito maior (Ellerbrock *et al.*, 2000; Mbulaiteye *et al.*, 2003). A co-infecção pelo HPV é a situação clínica de maior incidência em mulheres infectadas pelo HIV. Sabe-se que a persistência da infecção pelo HPV de alto risco é um fator importante e determinante do câncer invasor e que mecanismos imunológicos são necessários para controlar a infecção e promover o *clearance* viral. Assim, mulheres infectadas pelo HIV são mais suscetíveis à aquisição e aos danos decorrentes da infecção pelo HPV, com progressão mais rápida para lesões mais graves, pior resposta aos tratamentos disponíveis e maior índice de recidiva (Sun *et al.*, 1997; Ellerbrock *et al.*, 2000; Ahdieh *et al.*, 2001; Levi *et al.*, 2002; Palefsky, 2003; Spinillo *et al.*, 2006).

Nosso estudo inicialmente testou 120 mulheres, sendo que destas 60 eram HIV-positivas e 60 eram HIV-negativas. Ao analisar a amplificação do gene constitutivo GAPDH, obteve-se o DNA amplificável por PCR em 57 mulheres HIV-positivas e 57 mulheres HIV-negativas. A ausência de DNA amplificável em 6 do total de amostras, deve-se provavelmente, à pequena quantidade de células presente no material cervical e o ato de congelar e descongelar as amostras durante os testes, o que pode ter ocasionado a degradação do DNA dessas amostras.

A média de idade das mulheres HIV-positivas e HIV-negativas foi de respectivamente, 35 e 39 anos, similar aos encontrados em estudos realizados em São Paulo, Minas Gerais e Bahia (Levi *et al.*, 2002, Queiroz *et al.*, 2004;

Campos *et al.*, 2005). Paulo *et al.* (2007) em um estudo também realizado em São Paulo encontraram uma média de idade de 33 anos para as mulheres analisadas, assim como os dados de Heard *et al.* (2000). Um estudo como o *Women's Interagency HIV Study* (WIHS), que envolveu 2058 mulheres HIV-positivas, apresentou 42% das mulheres com idades entre 30 a 39 anos (Strickler *et al.*, 2005). Segundo dados do Ministério da Saúde no Brasil, a faixa etária mais representativa de mulheres infectadas pelo HIV situa-se entre 20 e 39 anos (Santos *et al.*, 2000). O que se percebe é que no Brasil, as infecções pelo HPV e o HIV são mais comuns em mulheres na idade reprodutiva. As lesões intra-epiteliais cervicais também são consideradas as doenças ginecológicas mais comuns nas mulheres em idade reprodutiva, nos Estados Unidos (Wright *et al.*, 2001).

Dentre as características sócio-demográficas e comportamentais analisadas em nosso estudo, diferenças significativas foram observadas com relação ao estado civil, renda familiar, escolaridade, idade da primeira relação sexual, número de parceiros sexuais, história de prostituição e tabagismo. O estado civil representa um importante fator de risco para a infecção pelo HIV e esta associação tem sido demonstrada em vários estudos. Ao avaliarmos o estado civil no grupo de mulheres HIV-positivas, verificamos que 66% eram solteiras, comparadas a 34% no grupo de mulheres HIV-negativas. Por outro lado, observou-se que 61,1% das mulheres casadas eram HIV-negativas e 38,9% eram HIV-positivas, concordando com os dados de outro estudo, em que a grande maioria das mulheres soronegativas encontrava-se casada ou amasiada (Campos *et al.*, 2005). Uma possível explicação para esse fato seria que as mulheres solteiras se expõem a um maior número de parceiros sexuais e não estariam usando métodos de barreira, como o uso de preservativos. O estado civil mostrou-se uma variável importante, uma vez que as mulheres casadas apresentaram percentagem mais baixa que as mulheres com outros estados civis, sendo que o estado civil "casada" foi considerado um fator de proteção com relação à infecção pelo HIV.

Nesse estudo, constatou-se que a maioria das pacientes em ambos os grupos tiveram sua vida sexual iniciada na adolescência. No grupo de mulheres HIV-negativas a média de idade da primeira relação sexual foi aos 18 anos de

idade (13-31 anos), sendo que no grupo de mulheres HIV-positivas, a média foi de 16 anos de idade (12-22 anos) com diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Queiroz *et al.* (2004) encontraram uma média de idade da primeira relação sexual de 17 anos de idade, sendo que 88% das mulheres HIV-positivas tiveram sua primeira relação sexual entre 12 a 22 anos, concordando com nosso estudo. Campos *et al.* (2005), constataram mediana de 18 anos em relação à idade do primeiro intercurso sexual, porém não demonstrou diferença significativa entre os grupos.

O início precoce da atividade sexual está relacionado com a infecção pelo HPV e é considerado um fator de risco para o câncer do colo uterino, possibilitando maior multiplicidade de parceiros, e maior oportunidade de adquirir infecções sexualmente transmissíveis, incluindo a AIDS (Nonnenmacher *et al.*, 2002). A infecção pelo HPV foi mais comum em mulheres jovens, sexualmente ativas, segundo Nonnenmacher *et al.* (2002) e a maioria das mulheres que desenvolveram o câncer do colo uterino iniciou a atividade sexual antes dos 18 anos de idade.

Quanto aos outros aspectos comportamentais com diferenças significativas entre os grupos, encontramos história de prostituição e o número de parceiros sexuais. Cerca de 90,9% das mulheres que relataram história de prostituição eram HIV-positivas, e este fato aumenta 11 vezes o risco de infecção pelo HIV. Ellerbrock *et al.* (2000) constataram que história de prostituição foi significativamente mais comum em mulheres HIV-positivas, quando comparada às mulheres HIV-negativas. Um estudo analisou 41 mulheres HIV-positivas e 38 HIV-negativas, e nove delas relataram história de prostituição, sendo que 19,6% das mulheres com história de prostituição eram HIV-positivas (Campos *et al.*, 2005). As mulheres que relataram ter de 4 a 10 parceiros sexuais e as que relataram ter acima de 10 parceiros sexuais correspondem, respectivamente, a 57,1% e 84,6% de mulheres HIV-positivas. Strickler *et al.* (2005) também evidenciaram que mulheres HIV-positivas apresentam um maior número de parceiros sexuais (23% HIV-positivas) quando comparadas às mulheres HIV-negativas (15% HIV-negativas).

Os fatores de risco mais importantes para a co-infecção HIV e HPV incluem múltiplos parceiros sexuais, sexo com homens que tiveram múltiplas

parceiras sexuais, idade precoce para a primeira relação sexual, baixo nível sócio-econômico e prática sexual sem proteção (Pinto *et al.*, 2002). No grupo de mulheres HIV-positivas, que relataram ter história de prostituição, 50% apresentavam o genoma do HPV. Nas mulheres que relataram ter de 4 a 10 parceiros sexuais e acima de 10 parceiros sexuais, o genoma do HPV foi detectado em, respectivamente, 45,8% e 27,3%, sugerindo uma maior exposição para adquirir doenças sexualmente transmissíveis, inclusive o HPV.

Estudos relatam que o tabagismo tem sido associado ao aumento do câncer cervical e suas lesões precursoras, porém sua potencial influência na história natural da infecção pelo HPV ainda é incerta (Castle *et al.*, 2002; Plummer *et al.*, 2003). Teoricamente o tabagismo pode aumentar a incidência e a persistência das infecções pelo HPV, em decorrência da supressão da imunidade local (Koshiol *et al.*, 2006). Por outro lado, o fumo pode regular citocinas específicas, protegendo a cérvix uterina contra o HPV e outras infecções virais, diminuindo assim o risco de infecção pelo HPV associado à neoplasia cervical (Eppel *et al.*, 2000). Em nosso estudo, diferenças significativas foram observadas em relação ao tabagismo nos dois grupos estudados. Dentre as mulheres que fumavam 69% eram HIV-positivas e 31% HIV-negativas. Já foi relatado que a infecção pelo HIV está associada com um aumento do risco de infecção persistente pelo HPV (Ahdieh *et al.*, 2000; Ahdieh *et al.*, 2001). Então, a associação entre o fumo e a persistência do HPV pode diferir entre mulheres HIV-positivas e mulheres HIV-negativas (Koshiol *et al.*, 2006).

Na avaliação referente à citologia oncótica cervical, em nosso estudo foi encontrado um maior número de anormalidades cervicais em mulheres HIV-positivas, comparadas às mulheres HIV-negativas. Porém essa diferença não foi significativa. Dentre as mulheres que apresentaram lesões de baixo grau (NIC I) e lesões de alto grau (NIC II/III), 100% e 85,7%, respectivamente, eram HIV-positivas. As alterações citológicas classificadas como ASCUS estavam presentes em 71,4% das mulheres HIV-positivas. Em contraste, as anormalidades citológicas encontradas nas mulheres HIV-negativas, incluíram 28,6% com ASCUS, e 14,3% com HSIL, sendo que, nenhuma LSIL foi encontrada.

Estudos realizados em São Paulo também demonstraram maior freqüência de anormalidades citológicas cervicais em mulheres HIV-positivas em

relação às mulheres HIV-negativas (Auge *et al.*, 2000; Levi *et al.*, 2002; Gonçalves *et al.*, 2003). Tornesello *et al.* (2008), analisando 112 mulheres HIV-positivas e 115 mulheres HIV-negativas, encontraram anormalidades cervicais em 29,5% das mulheres HIV-positivas, sendo 17% de ASCUS ou LSIL e 12,5% de HSIL. Entretanto, nas mulheres HIV-negativas, encontraram 6,9% de anormalidades cervicais, sendo 5,2% com ASCUS ou LSIL e apenas 1,7% com HSIL. Mulheres infectadas pelo HIV podem ter prevalência dez vezes maior de lesão intraepitelial escamosa, quando comparadas às mulheres soronegativas para o HIV (Davis *et al.*, 2001). Isto é relevante em vista do fato de que a infecção por certos tipos de HPV ter sido vinculada ao desenvolvimento de neoplasia cervical, associação já claramente estabelecida (Souza *et al.*, 2001; Bosch *et al.*, 2002; de Sanjosé & Palefsky, 2002). A associação entre a presença de lesões intraepiteliais cervicais e a imunodeficiência pelo HIV também já foi relatada anteriormente (Klein *et al.*, 1994; Six *et al.*, 1998). Entretanto, o mecanismo pelo qual a imunodeficiência causada pelo HIV aumenta o risco de SIL/NIC, ainda não está bem esclarecido. Acredita-se que a imunodeficiência causada pelo HIV pode aumentar a persistência da infecção pelo HPV ou permitir a replicação do HPV em altos níveis, aumentando o risco de progressão das SIL para o câncer. Achados citológicos diferentes foram observados por Ellerbrock *et al.* (2000), que encontraram uma incidência consideravelmente menor de SILs em mulheres infectadas pelo HIV comparadas às mulheres não infectadas pelo HIV. Diferenças entre esses estudos podem ser atribuídas à realização de outros exames citológicos como a colposcopia e biópsia nas diferentes populações estudadas.

De acordo com nosso estudo, o genoma do HPV foi encontrado em 37,5% das mulheres HIV-positivas e em 24,1% das mulheres HIV-negativas que apresentaram citologia oncótica normal. A citologia convencional de Papanicolaou mostrou-se menos sensível em detectar alterações citológicas sugestivas de infecção pelo HPV, quando comparada à técnica de PCR. Paulo *et al.* (2007) demonstraram sensibilidade para o exame de Papanicolaou de 38% comparada à PCR. Uma metanálise, envolvendo 28 estudos para verificar a acurácia da citologia no diagnóstico de NIC em mulheres HIV-positivas, encontrou sensibilidade de 58% e especificidade de 69%, comprovando a grande limitação

da citologia como instrumento para detecção de infecções pelo HPV em populações de alto risco para NIC (Fahey *et al.*, 1995). Outro estudo relacionando achados de citologia com os da histologia analisou 248 mulheres HIV-positivas, confirmando o valor limitado da citologia para o diagnóstico de NIC. Das 168 citologias normais, 87 (52%) tinham o genoma do HPV no exame histopatológico e 31 (18,5%) tinham algum grau de displasia (sensibilidade de 60% e especificidade de 81%) (Maiman *et al.*, 1998).

Com relação aos aspectos clínico-patológicos, diferenças significativas foram observadas entre os grupos em relação à detecção do DNA do HPV. Nosso estudo demonstrou uma prevalência mais alta do DNA do HPV em mulheres HIV-positivas quando comparadas às mulheres HIV-negativas. De acordo com nossos dados, o genoma do HPV foi detectado pela PCR em 64,3% das mulheres HIV-positivas e em 35,7% das mulheres HIV-negativas, apresentando diferença significativa entre os grupos estudados. A infecção pelo HIV aumentou 2,5 vezes o risco de infecção pelo HPV. Nossos dados confirmam estudos anteriores, que relatam que a infecção pelo HPV é significativamente mais freqüente em mulheres HIV-positivas, quando comparadas às mulheres HIV-negativas (Palefsky *et al.*, 1999; Ellerbrock *et al.*, 2000; Moscicki *et al.*, 2000). Outros estudos têm evidenciado que a freqüência de infecção pelo papilomavírus humano está relacionada com comprometimento pelo HIV (Auge *et al.*, 2000; Moscicki *et al.*, 2000; Strickler *et al.*, 2005; Paulo *et al.*, 2007).

Ahdieh *et al.* (2001) verificaram uma prevalência do genoma do HPV em 90,2% das mulheres HIV-positivas e 54,6% entre mulheres HIV-negativas. No Brasil observou-se uma prevalência de 78 a 98% do genoma do HPV, em mulheres HIV-positivas, empregando-se a metodologia de PCR, e de 64,5%, quando a técnica de captura híbrida foi usada (Sun *et al.*, 1995; Levi *et al.*, 2002; Levi *et al.*, 2004). Alguns desses estudos apresentaram a prevalência do HPV em relação ao tipo de lesão cervical, levando também em consideração o estado de imunossupressão e a quantificação da carga viral do HPV no colo do útero das pacientes infectadas pelo HIV (Zimmermann & Melo, 2002). Não foi possível o acesso aos dados de carga viral do HIV e de contagens de linfócitos TCD4+ de nossas pacientes.

Em outros estudos realizados no Brasil, como em Santos-SP, dentre 141 mulheres infectadas pelo HIV, o genoma do HPV foi detectado em aproximadamente 81% das pacientes (Gonçalves *et al.*, 1999). Campos *et al.* (2005) também constataram com o uso da técnica de PCR, uma frequência de 73,2% do genoma do HPV em mulheres HIV-positivas comparadas à 23,6% nas mulheres HIV-negativas. O estudo demonstrou uma chance 8,7 vezes maior para a presença do HPV nas mulheres HIV-positivas. Estudos que utilizam a técnica de PCR para detecção do genoma do HPV são usados desde 1992 e demonstram prevalências entre 40 a 98% nas mulheres HIV-positivas e de 13 a 56% nas mulheres HIV-negativas (Palefsky *et al.*, 2001; Ferenczy *et al.*, 2003).

Heard *et al.* (2000) analisando 307 mulheres HIV-positivas, detectaram o DNA do HPV em 49,5%, com o uso da técnica de PCR, sendo que 24,8% dessas mulheres apresentaram-se com ASCUS e 27% com NIC (13,7% com LSIL e 13,3% com HSIL). Em mulheres HIV-positivas, Moscicki *et al.* (2000) encontraram uma prevalência de 77,4% do DNA do HPV, comparadas à 54,5% em mulheres HIV-negativas, usando a técnica de PCR. Nesse mesmo estudo, o DNA do HPV foi encontrado em 61,7% das mulheres HIV-positivas que apresentaram achados citológicos normais, comparadas a 56,8% em mulheres HIV-negativas. Dentre as mulheres com infecção pelo HPV, 70% das mulheres HIV-negativas apresentaram achados citológicos normais, comparadas a 29,9% das mulheres HIV-positivas. Levi *et al.* (2002), analisando mulheres infectadas pelo HIV, encontraram uma prevalência do DNA do HPV em 64,5% dessas mulheres, sendo que em 19%, anormalidades citológicas compatíveis com NIC foram detectadas (12% NICI, 5% NICII e 2% NIC III).

Altas prevalências de SILs estão associadas com a infecção pelo HPV em mulheres HIV-positivas. Nosso estudo demonstrou uma associação estatisticamente significativa, entre a detecção do genoma do HPV e a presença de lesões intraepiteliais de alto grau, no grupo de mulheres HIV-positivas. Todas as mulheres HIV-positivas que apresentaram lesões intraepiteliais de alto grau tiveram amostras cervicais positivas para a detecção do genoma do HPV.

Auge *et al.* (2000) encontraram uma alta prevalência (86,7%) de infecção pelo HPV nos casos de NIC em mulheres HIV-positivas, concordando com nosso estudo. Em outro estudo, a infecção pelo HPV também foi associada

às SIL, com taxas mais altas entre as mulheres HIV-positivas comparadas às mulheres HIV-negativas (Moscicki *et al.*, 2000). Nesse mesmo estudo, o DNA do HPV foi detectado em 90,9% das mulheres infectadas pelo HIV, que apresentaram SILs. Cerca de 90% das mulheres HIV-positivas com ASCUS também foram positivas para o DNA do HPV, comparadas a 42,9% das mulheres HIV-negativas. Ellerbrock *et al.* (2000) também encontraram associação significativa entre o desenvolvimento de SILs e a presença do DNA do HPV. As taxas mais altas de HPV e SILs em mulheres HIV-positivas podem ser atribuídas especificamente ao estado de imunossupressão ou às diferenças nos estágios da história natural da infecção pelo HPV ou HIV.

Em um recente estudo, em que foram analisadas 328 mulheres infectadas pelo HIV e 325 mulheres não infectadas, o DNA do HPV foi detectado em 54% das mulheres HIV-positivas comparadas a 32% das mulheres HIV-negativas, utilizando a técnica de PCR. Dentre as mulheres infectadas pelo HIV, 20% apresentaram SIL, sendo que 91% correspondiam às lesões intraepiteliais de baixo grau e 9% às lesões de alto grau. Entretanto, entre as mulheres HIV-negativas 5% apresentaram SIL, sendo 75% com lesões intraepiteliais de baixo grau e 25% com lesões de alto grau. Mulheres infectadas pelo HIV apresentam um risco 4,5 vezes maior de desenvolver lesões intraepiteliais (Ellerbrock *et al.*, 2000). Em estudo realizado no Brasil, o genoma do HPV foi encontrado em 91% dos casos de NIC ou carcinoma, em mulheres HIV-positivas, concordando assim com os dados encontrados em nosso estudo. (Queiroz *et al.*, 2004).

Nosso estudo demonstrou diferenças significativas em relação à genotipagem do HPV-16 e HPV-18. Dentre as 57 amostras cervicais obtidas de mulheres HIV-positivas, 27 apresentaram o genoma do HPV, e em todas estas o HPV-16 foi detectado, correspondendo a 67,5% dos casos. Esse valor foi significativamente diferente dos 32,5% detectados nas mulheres HIV-negativas. O HPV -16 foi o tipo mais prevalente em ambos os grupos de mulheres analisadas. O HPV -18 também foi o mais prevalente nas mulheres HIV-positivas (72,2%), comparado a 27,8% no grupo de mulheres HIV-negativas. Estudos realizados no Brasil e na Índia também encontraram o HPV-16 como sendo o tipo mais prevalente entre as mulheres infectadas pelo HIV, reforçando assim, os nossos resultados (Gonçalves *et al.*, 1999; Levi *et al.*, 2004; Joshi *et al.*, 2005). Gonçalves

et al. (1999), ao analisarem 141 mulheres HIV-positivas, detectaram os tipos 16 e 18 (30,5%) como os tipos de HPV mais prevalentes. Uma investigação sobre a prevalência do papilomavírus humano no câncer cervical, com perspectiva mundial, demonstrou os tipos de HPV mais prevalentes nas diferentes regiões geográficas. O HPV-16 estava presente em 50% dos espécimes cervicais e o HPV 18 em 14%. A infecção pelo HPV-16 foi a mais prevalente em todos os países, exceto na Indonésia, onde o HPV-18 foi o mais comum (Bosch *et al.*, 1995). No Brasil, Rabelo-Santos *et al.* (2003) em Goiânia- GO, encontraram o DNA do HPV presente em 76% das pacientes com diagnóstico de NICIII e câncer cervical, sendo o HPV-16 o tipo mais prevalente.

Um estudo de metanálise, abrangendo os Continentes da América do Norte, África, Ásia Europa e Américas do Sul e Central, avaliou a prevalência dos tipos de HPV em 5.578 mulheres infectadas pelo HIV (Clifford *et al.*, 2006). Nas Américas do Sul e Central, mais especificamente no Brasil e no México, foram analisadas 435 mulheres HIV-positivas, correspondendo a 7,8% do total mundial. Essa pesquisa demonstrou que a proporção de mulheres HIV-positivas com HPV-16 aumentou com conseqüente aumento da gravidade das lesões cervicais. Entretanto, a prevalência do HPV-16 foi baixa nessas mulheres. Em um estudo realizado em São Paulo, 208 mulheres HIV-positivas foram analisadas e em 100% de suas amostras cervicais foi detectado o genoma do HPV, sendo o HPV-16 o tipo mais prevalente (39,2%), seguido pelo HPV-51 (31,9%), HPV-11 (26%), HPV-18 (24%) e HPV-16 (22,5%) (Levi *et al.*, 2002).

A persistência da infecção pelo HPV e a multiplicidade de tipos, particularmente de alto risco oncogênico, são co-fatores importantes na determinação das modificações celulares induzidas pelo HPV. Estas duas condições são frequentemente encontradas entre as mulheres infectadas pelo HIV (Palefsky & Holly, 2003; Levi *et al.*, 2004; Luque *et al.*, 2006; Clifford *et al.*, 2006). A infecção dupla com o HPV-16 e HPV- 18 foi detectada neste estudo, em 72,2% das mulheres HIV-positivas e em 27,8% das mulheres HIV-negativas, com diferença significativa entre os grupos estudados.

Um estudo desenvolvido na Bahia descreveu o HPV-16 como o tipo de HPV mais prevalente entre as mulheres HIV-positivas e HIV-negativas (Queiroz *et al.*, 2004). Munoz *et al.* (2003) em um estudo que abrangeu vários países,

também encontrou o HPV-16 como o tipo mais prevalente, com taxas variando de 43,9% nas Filipinas a 72,4% em Marrocos. A infecção pelo HPV-16 é um importante fator para a progressão da doença cervical e está associado com uma maior persistência da infecção quando comparado a outros tipos de HPV (Syrjanen & Syrjanen, 2000). Dados de um estudo longitudinal sugerem que existe um risco muito alto da infecção pelo HPV-16 progredir de lesões intraepiteliais escamosas de alto grau para o câncer cervical, em um período de 5 anos. O HPV-16 tem a habilidade de evadir as células do sistema imune em pacientes imunocompetentes (Villa *et al.*, 2002; Nicol *et al.*, 2005).

Um estudo desenvolvido em São Paulo descreveu os tipos de HPV-16 e HPV-18 como sendo os mais prevalentes e as infecções múltiplas foram constatadas em 45% das portadoras do HIV. No Brasil foram observadas freqüências de 7,5% de infecção por um ou mais tipos de HPV de baixo grau e 33% dos casos de infecção com um ou mais tipos de HPV de alto grau. Em outro estudo estes autores relatam presença de múltiplos genótipos em 78,9% das mulheres soropositivas. Entretanto, nenhuma associação significativa foi demonstrada entre os genótipos do HPV e a classificação citológica (Levi *et al.*, 2002). A alta prevalência de tipos de HPV de alto risco em ambos os grupos pode explicar em parte a persistência da infecção pelo HPV, contribuindo assim para o aparecimento de LSIL, com posterior progressão para o câncer.

Alguns autores descrevem que a presença de múltiplos tipos de HPV em pacientes infectadas pelo HIV é explicada pelo reaparecimento dos tipos de HPV que estavam latentes e pela aquisição de novos tipos (Jin *et al.*, 2001; Broker *et al.*, 2001). Uma teoria alternativa é a de que as infecções por múltiplos tipos de HPV possam ter algum benefício para a sobrevivência do HPV. Isto ocorreria porque se a perda do controle imunológico permite a replicação de múltiplos vírus, então é esperado que a persistência do vírus também ocorra em níveis indetectáveis (Palefsky & Holly, 2003). Por algum tempo, acreditou-se que os diferentes tipos de HPV competiam para infectar o trato genital e que, portanto, a eliminação de um tipo facilitaria a infecção por outros. Entretanto, atualmente, acredita-se na existência de maior risco de aquisição de outro tipo, quando já existe infecção prévia. Se a co-infecção confere benefício de sobrevivência

mútua, a eliminação de um tipo poderia ter efeitos benéficos inesperados na história natural dos outros (Woodman *et al.*, 2007).

O motivo pelo qual as mulheres portadoras do HIV são infectadas por múltiplos tipos de HPV merece investigação futura. A constatação de múltiplos tipos virais de HPV em alta porcentagem sugere que muitas pacientes adquirem tipos adicionais de HPV no momento da infecção pelos tipos mais prevalentes, como o HPV-16 e HPV-18. Tipos de HPV adicionais de alto e baixo risco podem ficar retidos em quantidade pequena em pacientes saudáveis, mas podem começar a replicar nas imunodeprimidas (Brown *et al.*, 1999). Uma publicação sobre imunossupressão e co-infecção tenta explicar essa associação, pela possibilidade de mais exposição dessas mulheres às relações sexuais desprotegidas e à perda do controle imunológico. Isso levaria à replicação de mais tipos virais (perda da imunidade tipo-específica para HPV), suficiente para permitir a detecção dos genótipos do HPV por testes de PCR (Palefsky & Holly, 2003). Entretanto, essas hipóteses ainda não foram comprovadas.

Comparando os nossos resultados com os de outros autores, verificou-se que a infecção múltipla foi característica marcante nas pacientes portadoras do HIV (Palefsky & Holly, 2003; Levi *et al.*, 2004; Moscicki *et al.*, 2004; Joshi *et al.*, 2005; Clifford *et al.*, 2006). Estudos prospectivos são necessários para determinar a influência que as infecções por múltiplos tipos de HPV exercem na história natural das lesões do colo uterino, especialmente em pacientes infectadas pelo HIV.

Determinar a prevalência dos genótipos do HPV e a sua multiplicidade em cada população constitui etapa preliminar e fundamental para se proporem estratégias de prevenção e monitoramento mais adequadas à realidade da nossa população nos serviços de saúde. Como contribuição individual, a genotipagem permite a classificação das pacientes com HPV em grupos de alto e baixo risco para o desenvolvimento de câncer cervical; como contribuição coletiva, permite o planejamento para introdução de estratégias de prevenção voltados para os tipos mais freqüentes em cada população.

Sugerimos que a genotipagem seja proposta para mulheres portadoras do HIV, seja como forma de estabelecer o prognóstico das lesões cervicais nessas mulheres, seja como forma de detecção de novos tipos virais do HPV.

Pré-adolescentes e adolescentes infectadas pelo HIV devem ser consideradas como grupos prioritários na vacinação profilática contra o HPV, uma vez que a vacina quadrivalente, demonstrou reduzir a incidência de lesões ano-genitais associadas ao HPV (Joura *et al.*, 2007; Garland *et al.*, 2007; Future II Group, 2007). A eficácia dessas vacinas dependeria de vários fatores, dentre eles do acometimento prévio pelos tipos de HPV incluídos na vacina. Em nosso estudo, 67,5% das mulheres HIV-positivas apresentavam o HPV-16 e 72,2% apresentavam infecção dupla com o HPV-16 e HPV18, tipos presentes na vacina quadrivalente, já aprovada para uso profilático.

Este estudo confirma a alta prevalência do HPV e sua multiplicidade na cérvix uterina de mulheres infectadas pelo HIV. Além disso, contribui para demonstrar a importância do estudo populacional para o planejamento adequado de programas de prevenção, sugerindo a necessidade de estudos futuros que possam esclarecer o papel do HIV na maior prevalência e multiplicidade da infecção pelo HPV.

8 CONCLUSÕES

1) Comparando-se os aspectos sócio-demográficos e comportamentais entre os dois grupos de pacientes, observou-se diferença significativa em relação ao estado civil, renda familiar, escolaridade, idade da primeira relação sexual, número de parceiros sexuais, história de prostituição e tabagismo;

2) As alterações citológicas cervicais compatíveis com infecção pelo HPV foram mais comuns em pacientes HIV-positivas, incluindo as de significado indeterminado, lesões de baixo grau e lesões de alto grau; comparadas às mulheres HIV-negativas;

3) O genoma do HPV foi mais prevalente em amostras cervicais de mulheres HIV-positivas, sugerindo que a infecção pelo HIV representa um importante fator de risco para a infecção pelo vírus HPV.

4) O HPV-16 foi o genótipo viral mais prevalente em ambos os grupos estudados.

5) A infecção dupla (HPV-16 e HPV-18) foi mais prevalente nas mulheres HIV-positivas.

6) Uma associação estatisticamente significativa foi observada entre a presença de lesões intraepiteliais de alto grau (NIC II/NICIII) e a detecção do DNA do HPV, em amostras cervicais de mulheres HIV-positivas.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHDIEH, L.; MUNOZ, A.; VLAHOV, D. *et al.* Cervical neoplasia and repeated positivity of human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-seropositive and seronegative women. *Am J Epidemiol* 2000; 151: 1148-57.
2. AHDIEH, L.; KLEIN, R. S.; BURK, R. *et al.* Prevalence, incidence, and type-specific persistence of human papillomavirus in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative women. *J. Infect. Dis.* 2001; 184: 682-690.
3. ANDERSSON, S.; HANSSON, B.; NORMAL, I. *et al.* Expression of E6/E7 mRNA from "high risk" human papillomavirus in relation to CIN grade, viral load and p161 NK4a. *int j Oncol.* 2006; 29: 705-711.
4. AUGÉ, A. P. F.; PIATO, S.; FRADE, A. B. *et al.* Frequência de neoplasia intra-epitelial cervical em portadoras do vírus da imunodeficiência humana. *Revista Brasileira* 2000; v. 22, n. 9.
5. BASEMAN, J. G.; KOUTSKY, L. A. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 2005; 32 Suppl 1: S16-24.
6. BASTIAN, L.; DATTA, S.; HASSELBLAD, V. *et al.* Evaluation of cervical cytology. Rockville, Md: Agency for health care policy and research (AHCPR). Evidence report/technology, assesment prepared by duke university under contract 1999; 290-97-0014.
7. BEKKERS, R. L.; MEIJER, C. J.; MASSUGER, L. F. *et al.* Effects of HPV detection in population-based screening programmes for cervical cancer; a Dutch moment. *Gynecol Oncol* 2006; 100: 451-4
8. BERNARD, H. U.; CALLEJA-MACIAS, I. E.; DUNN, S. T. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer* 2006; 118: 1071-6.
9. BOCCALON, M.; TIRELLI, U.; SOPRACORDEVOLÉ, F. *et al.* Intra-epithelial and invasive cervical neoplasia during HIV infection. *Eur J Cancer* 1996; 32: 2212-17.
10. BORY, J. P.; CUCHEROUSSET, J.; LORENZATO, M. *et al.* Recurrent human papillomavirus infection detected with the hybrid capture II assay selects women with normal cervical smears at risk for developing high grade cervical lesions: a longitudinal study of 3,091 women. *Int J Cancer* 2002; 102: 519-25.
11. BOSCH, F. X.; MANOS, M. M.; MUNOZ, N. *et al.* Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *International*

- Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. *J. Natl. Cancer Inst* 1995; 87: 796-802.
12. BOSCH F. X.; LORINCZ A.; MUNOZ N. *et al.* The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer (published comment appears in *J Clin Pathol*.2002; 55:244-265.
 13. BOSCH, F. X.; de SANJOSÉ, S. Human Papillomavirus and Cervical Cancer- Burden and Assessment of Causality. *J National Cancer Inst Monogr* 2003; 31:3-13.
 14. BRAIN, L. Role of Human Immunodeficiency Virus Infection in the Pathogenesis of Human Papillomavirus-Associated cervical Neoplasia. *Am J Pathol* 1994; 114(2).
 15. BROKER, T. R.; JIN, G.; CROOM-RIVERS, A. *et al.* Viral latency – the papillomavirus model. *Dev Biol (Basel)* 2001; 106: 443-51.
 16. BROWN, D. R.; BRYAN, J. T.; WOOLS, K. *et al.* Detection of Human papillomavirus L1 Protein in Condylomata Acuminata From Adults With Defects in Cell-Mediated Immunity. *J Med Virology*. 1993; 64: 79-84.
 17. BROWN T, .YEN-MOORE, A.; TRYING, S. An overview of sexually transmitted diseases. Part II. *J Am Acad Dermatol* 1999; 41:661-77;quiz 678-80.
 18. BURK, R. D.; KELLY, P.; FELDMAN, J. *et al.* Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex Transm Dis*. 1996; 23: 333-41.
 19. CAMPOS, R.R. Prevalência do papilomavírus humano e seus genótipos em mulheres portadoras e não-portadoras do vírus da imunodeficiência humana. *Rev. Bras. Ginecol Obstet*. 2005; 27(5): 248-56.
 20. CAPPIELLO, G.; GARBUGLIA, A. R.; SALVI, R. *et al.* HIV infection increases the risk of squamous intra-epithelial lesions in women with HPV infection: an analysis of HPV genotypes. DIANAIDS collaborative study group. *Int J Cancer* 1997; 72: 982-6.
 21. CARDILLO, M. R.; HAGAN, J.; ABADI; M. A. CD4 T-cell count, viral load, and squamous intraepithelial lesions in women infected with the human immunodeficiency virus. *Cancer* 2001; 93: 111-114.
 22. CASTELLSAGUÉ, X.; GHAFARI, A.; DANIEL, R. W. *et al.* Prevalence of penile human papillomavirus DNA in husbands of women with and without cervical neoplasia: a study in Spain and Colombia. *J Infect Dis*. 1997; 176:353-61.
 23. CASTELLSAGUÉ, X.; DIAZ, M.; DE SANJOSE, S. *et al.* and the International Agency for Research on Câncer Multicenter Cervical Câncer Study Group. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its

- cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst.* 2006; 98: 303-315.
24. CASTLE, P. E.; WACHOLDER, S.; LORINCZ, A. T. *et al.* A prospective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus-infected women. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 1406-14.
 25. CATES, W. Jr. Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States. American Social Health Association Panel. *Sex Transm Dis.* 1999; 26: S2-S-7.
 26. CHEN, S. L. ; HAN, C. P. ; TSAO, Y.P. *et al.* Identification and typing of human papillomavirus in cervical cancer in Taiwan. *Cancer* 1993; 72: 1939-45.
 27. CLARKE, B.; CHETTY, R. Postmodern câncer: the role of human immunodeficiency virus in uterine cervical cancer. *J Clin Pathol: mol Pathol* 2002; 55: 19-24.
 28. CLAVEL, C.; MASURE, M; BORY J. P. *et al.* Hybrid capture II-based human papillomavirus detection a sensitive test to detect in routine high-grade cervical lesions: a preliminary study on 1518 women. *Br J Cancer* 1999; 80: 1306-11.
 29. CLIFFORD, G. M.; GALLUS, S.; HERRERO, R. *et al.* Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet*, 2005; v. 366, n. 9490, p. 991-8.
 30. CLIFFORD, G. M.; GONÇALVES, M. A.; FRANCESCHI, S. Human papillomavirus types among women infected with HIV: a metaanalysis. *AIDS.* 2006; 20, 2337-2344.
 31. CONCHA, M. R. Diagnóstico y terapia del vírus papiloma humano. *Rev. Chil Infect.* 2007; 24(3): 209-214.
 32. CONTI, M.; AGAROSSO, A.; PARAZZINI, F. *et al.* HPV, HIV infection, and risk of cervical intraepithelial neoplasia in former intravenous drug abusers. *Gynecol Oncol* 1993; 49: 344-8.
 33. COX, J. T. The development of cervical cancer and its precursors: what is the role of human papillomavirus infection? *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2006; 18 Suppl 1: s5-s13.
 34. CROWLEY-NOWICK, P. A.; ELLENBERG, J. H.; VERMUND, S. H. *et al.* Cytokine profile in genital tract secretions from female adolescents: impact of human immunodeficiency virus, human papillomavirus, and other sexually transmitted pathogens. *J. Infect. Dis.* 2000; 181: 939-945.
 35. CUZICK, J.; BEVERLEY, E.; HO, L. *et al.* HPV testing in primary screening of older women. *Br J Cancer* 1999; 81: 554-558.

36. DAVIS, A. T.; CHAKRABORTY, H.; FLOWERS, L. *et al.* Cervical dysplasia in women infected with the human immuno-deficiency virus (HIV): a correlation with HIV viral load and CD⁴+ count. *Gynecol Oncol* 2001; 80: 350-354.
37. DE FRANCESCO, M. A.; GARGIULO, F.; SCHREIBER, C. *et al.* Detection and genotyping of human papillomavirus in cervical samples from italian patients. *J. Med Virol.* 2005; 75: 588-592.
38. DE LIMA, S. V.; DE MESQUITA, A. M.; CAVALCANTE, F. G. *et al.* Sexually transmitted infections in a female population in rural north-east Brazil: prevalence, morbidity and risk factors. *Trop Med Int Health* 2003; v. 8, n. 7, p. 595-603.
39. DE SANJOSE, S.; PALEFSKY, J. Cervical and anal HPV infections in HIV positive women and men. *Virus Res* 2002; 89: 201-11.
40. DE SANJOSE, S.; DIAZ, M.; CASTELLSAGUE, X. *et al.* Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7: 453-9.
41. DE VILLIERS, E. M. Taxonomic classification of human papillomaviruses. *Papillomavirus Report*, 2001; 12: 57-63.
42. DE VILLIERS, E. M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R. *et al.* Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; v. 324, n. 1, p. 17-27
43. DEHN, D.; TORKKO, KATHLEEN, C. *et al.* Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer Cytopathology*. 2007, v. 111, n. 1.
44. DELMAS, M. C. C.; LARSEN, B.; VAN BENTHEM, F. F. *et al.* Cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women: prevalence, incidence and regression. *AIDS* 2000; 14:1775-1784.
45. DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005; 32 (suppl 1): S7-15.
46. DUENSING, S.; LEE, L. Y.; DUENSING, A. *et al.* The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 10002-10007.
47. DUENSING, S.; MUNGER, K. Centrosome abnormalities, genomic instability and carcinogenic progression. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1471: M81-M-88.
48. DUERR, A.; KIEKE, B.; WARREN, D. *et al.* Human papillomavirus-associated cervical cytologic abnormalities among women with or at risk of infection with human immunodeficiency virus. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184: 584-90.
49. DUERR, A.; PARAMSOTHY, P.; JAMIESON, D. J. *et al.* Effect of HIV

infection on atypical squamous cells of undetermined significance. *Clin Infect Dis* 2006; v. 42, n. 6, p. 855-61.

50. ELLERBROCK, TEDD, V. M. D.; CHIASSON, M. A. *et al.* Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women. *JAMA* 2000; 283(8), 1031-1037.
51. EPPEL, W.; WORDA, C.; FRIGO, P. *et al.* The influence of cotinine on interleukin 6 expression in smokers with cervical preneoplasia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; 79: 1105-11.
52. FAHEY, M. T.; INVIG, L.; MACASKILL, P. Meta-analysis of pap test accuracy. *Am J Epidemiol.* 1995; 141: 680-689.
53. FDA- Food and Drug Administration. Licenses quadrivalent human papillomavirus (types 6,11,16,18). Recombinant vaccine (gardasil for the prevention of cervical cancer and other diseases in females caused by human papillomavirus. (online) Disponível: <http://www.fda.gov>
54. FERENCZY, A.; MITAO, M.; NAGAI, N. *et al.* Latent papillomavirus and recurring genital warts. *N. Engl J Med* 1985; 313: 784.
55. FERENCZY, A.; COUPLÉE, F.; FRANCO, E. *et al.* Human papillomavirus and HIV coinfection and the risk of neoplasias of the lower genital tract: a review of recent developments. *Can Med Am Journal.* 2003; 169(5): 431-4.
56. FERLAY, J.; BRAY, F.; PISANI, P. *Globocan 2002: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 2.0: IARC Cancer Base n° 5.* Lyon: IARC Press, 2004.
57. FRANCESCHI, S.; HERRERO, R.; CLIFFORD, G. M. *et al.* Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int J Cancer* 2006; 119: 2677-84.
58. FRANCO, E. L. Cancer causes revisited: human papillomavirus and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst,* 1995; 87(11): 779-80.
59. FRANCO, E. L. *et al.* Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1999; 180, n. 5, p. 1415-23.
60. FRANCO, E. L.; DUARTE, E. F.; FERENCZY, A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ.* 2001; 164: 1017-25.
61. FRANCO, E. L.; HARPER, D. M. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical control. *Vaccine* 2005; 23: 2388-94.
62. FREEMAN, H.; WINGROVE, B. Excess Cervical Cancer Mortality: A marker for low access to health care in poor communities. NIH Pub. Rockville, MD:

National Cancer Institute, Center to reduce cancer health disparities 2005; n. 05-5282.

63. FRISCH, M.; BIGGAR, R. J.; GOEDERT, J. J. Human papillomavirus associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *J Natl Cancer Inst* sep. 2000; 20: 92(18): 1500-10.
64. FUTURE II Study Group. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. *N Engl J Med*. 2007; 356(19):1915-27.
65. GARLAND, S. M.; HERNANDEZ-AVILA, M.; WHEELER, C. M. *et al.* Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med*. 2007; 356 (19): 1928-43.
66. GIARRÈ, M.; CALDEIRA, S.; MALANCHI, I. *et al.* Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16 INK4a: imposed G1 cell cycle arrest. *J Virol* 2001; v. 75, pl. 4705-12.
67. GOLLNICK, H.; BARASSO, R.; JAPPE, U *et al.* Safety and efficacy of imiquimod 5% cream in the treatment of penile genital warts in uncircumcised men when applied three times weekly or once per day. *Int J STD AIDS*. 2001; 12: 22-8.
68. GONÇALVES, M. A. G., MASSAD, E., BURATTINI, M. N. *et al.* Relationship between human papillomavirus (HPV) genotyping and genital neoplasia in HIV-positive patients of Santos City, São Paulo, Brazil. *Int. J. AIDS* 1999; 10: 803-807.
69. GONÇALVES, M. A.; BURATTINI, M. N.; DONADI, E. A. *et al.* Anogenital warts contributing to the risk of squamous intraepithelial lesions among HIV-positive women of São Paulo, Brazil. *Int J STD AIDS*. 2003; 14(5): 309-13.
70. GRAVITT, P. E.; PEYTON, C. L.; ALESSI, T. Q. *et al.* Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J. Clin. Microbiol* 2000; 38: 357-361.
71. GROSS, G.; VON KROGH, G.; BARRASSO, R. Human papillomavirus infections in dermatovenereology. Therapy - genitoanal lesions. Boca Ratón: CRC-Press; (USA) 1997; p. 389.
72. HADER, S. L.; SMITH, D. K.; MOORE, J. S. *et al.* HIV infection in women in the United States: Status at the millennium. *JAMA* 2001; 285: 1186-92.
73. HANDSFIELD, H. H. Clinical presentation and natural course of anogenital warts. *Am J Med*. 1997; 102:16-20.
74. HARPER D. M. ; FRANCO, E. L.; WHEELER C. *et al.* Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in Young women: a randomised controlled Trial. *Lancet* 2004; 364(9447):1757-65.

75. HEARD, I.; TASSIE, J. M.; SCHMITZ, V. *et al.* Increased risk of cervical disease among human immunodeficiency virus-infected women with severe immunosuppression and high human papillomavirus load. *Obstet. Gynecol* 2000; 96: 403-409.
76. HERRERO, R.; HILDESHEIM, A.; BRATTI, C. *et al.* population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 6, p. 464-74.
77. HESELMAYER, K.; DU MANOIR, S.; BLEGEN, H. *et al.* A recurrent pattern of chromosomal aberrations and immunophenotypic appearance defines anal squamous cell carcinomas. *Br J Cancer* 1997; 76: 1271-1278.
78. HIDALGO, A.; SCHEWE, C.; PETERSEN, S. *et al.* Human papilloma virus status and chromosomal imbalances in primary cervical carcinomas and tumour cell lines. *Eur J Cancer* 2000; 36: 542-548.
79. HILDESHEIM, A.; WANG, S. S. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Res* 2002; 89: 229-40.
80. HO, G., BIERMAN, R., BEARDSLEY L. *et al.* Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *New Eng J Med* 1998; 338(7): 423-428.
81. HOLOWAY, P., MILLER, A. B., ROHAN, T. *et al.* Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999; 91: 252-258.
82. HOORY, T.; MONIE, A.; GRAVITT, P. *et al.* Molecular epidemiology of human papillomavirus. *J Formos Med. Assoc.* 2008; v. 107, n. 3.
83. HOWLEY, P. M.; FIELDS, B.; KNIPE, D. M. Papillomaviridae and their replication. *Fundamental Virology*. 2 ed. New York: Ravar Press 1996; p. 947-78.
84. INCA - Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro 2008. <http://www.inca.gov.br/> . Acessado 30 de outubro de 2008.
85. IARC-International Agency for Research on Cancer. Human papillomaviruses, v. 64. Geneva: World Health Organization, 1995.
86. IARC-International Agency for Research on Cancer. Cancer Database.Cancer Mondial. Globocan 2002.
87. JACOBSON, M. A.; SCHRIER, R.; MCCUNE, J. M. *et al.* Cytomegalovirus (CMV)-specific CD4 + T lymphocyte immune function in long-term survivors of AIDS-related CMV end-organ disease who are receiving potent antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2001; 183: 1399-1404.

88. JAMIESON, D. J.; DUERR, A.; BURK, R. *et al.* Characterization of genital human papillomavirus infection in women who have or who are at risk of having HIV infection. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 21-7.
89. JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E. *et al.* Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin.* 2006; 56: 106-130.
90. JIN, G.; HOESLEY, C.; CROOM-RIVERS, A. *et al.* High prevalence of novel HPV genotypes in women with AIDS: is HPV commensal viral microflora of the genital mucosa? 19th International HPV Conference, 2001; Sept 1-7; Florianópolis (Brazil).
91. JOSHI, S. N.; GOPALKRISHNA, V. ; KUMAR, B. K. *et al.* Cervical squamous intra-epithelial changes and human papillomavirus infection in women infected with human immunodeficiency virus in pune. *J Med Virol, Netherland,* 2005; 76: 470-475.
92. JOURA, E. A.; LEODOLTER, S.; HERNANDEZ-AVILA, M *et al.* Efficacy of a quadrivalent prophylactic human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like-particle vaccine against high-grade vulval and vaginal lesions: a combined analysis of three randomised clinical trials. *Lancet.* 2007; 369 (9574): 1693-702. D.I.
93. KAHN, J. A.; BERNSTEIN D.I. Human papillomavirus vaccines and adolescents. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005; 17(5):476-82.
94. KIRCHHOFF, M.; ROSE, H.; PETERSON, B. L. *et al.* Comparative genomic hybridization reveals a recurrent pattern of chromosomal aberrations in severe dysplasia/carcinoma in situ of the cervix and in advanced-stage cervical carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 24: 144-150.
95. KJAER, S. K.; VAN DEN, A. J. B.; BOCK, J. E. *et al.* Human papillomavirus- the most significant risk determinant of cervical intraepithelial neoplasia. *Int. J. Cancer* 1996; 65: 601-606.
96. KJAER, S. K.; SVARE, E. I. ; WORM, A. M. *et al.* Human papillomavirus infection in Danish female sex workers. Decreasing prevalence with age despite continuously high sexual activity. *Sex Transm Dis* 2000; v. 27, n. 8, p. 438-45.
97. KLEIN, R. S.; HO, G. Y.; VERMUND, S. H. *et al.* Risk factors for squamous intraepithelial lesions on Pap smear in women at risk for human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1994; 170: 1404-9.
98. KOBAYASHI, A.; GREENBLATT, R. M.; ANASTOS, K. *et al.* Functional attributes of mucosal immunity in cervical intraepithelial neoplasia and effects of HIV infection. *Cancer Res* 2004; 64: 6766-6774.
99. KOJIC, E. M.; CU-UVIN, S. Update: human papillomavirus infection remains highly prevalent and persistent among HIV-infected individuals. *Curr Opin Oncol* 2007; 19: n. 5, p. 464-9.

100. KOMANDURI, K. V.; DONAHOE, S. M.; MORETTO, W. J. *et al.* Direct measurement of CD4+ and CD8+ T-cell responses to CMV in HIV-1-infected subjects. *Virology* 2001; 279: 459-470.
101. KOSHIOL, Jill. Smoking and time to clearance fo human papillomavirus infection in HIV-seropositive and HIV-seronegative women. *Am I Epidemiol* 2006; 164:176-183.
102. KOUTSKY, L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 1997; v. 102, n. 5A., p. 3-8.
103. LANG, A.; WIKSTROM, I.; WILANDER, E. Significance of HPV testes on women with cervical smears showing ASCUS. *Acta Obste Gynecol Scand*, Copenhagen, 2005; 84: 1001-1005.
104. LASSUS, J.; HAPPONEN, H.; RANKIA, A. Carbon dioxide (CO₂)-laser therapy cures macrospic lesions, but viral genome is not eradicated in men with therapy-resistant HPV infection. *Sex Transm Dis.* 1994; 21: 297-302.
105. LAURO, C.; AMMATURO, F. P.; QUIRINO, L. *et al.* Evaluation of partners of women with HPV infection. *Minerva Ginecol.* 2000; 52: 503-7.
106. LEFEVRE, J., HANKINS, C.; MONEY, D. *et al.* Human papillomavirus type 16 viral load is higher in human immunodeficiency vírus-seropositive women with high-grade squamous intraepithelial lesions than in those with normal cytology smears. *Journal of Clinical Microbiology.* May 2004;p. 2212-2215.
107. LEVI, J. E.; FINK, M. C.; CANTO, C. L. *et al.* Human papilomavirus prevalence, viral load and cervical intraepithelial neoplasia in HIV-infected nomen. *Braz J Infect Dis* 2002; 6: 129-35.
108. LEVI, J. E.; FERNANDES, S.; TATENO, A. F. *et al.* Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. *Gynecol Oncol* 2004; 92: 225-231.
109. LEVI, G.; FELDMAN, J.; HOLMAN, S. *et al.* Relationship between HIV viral load and Langerhans cells of the cervical epithelium. *J Obstet Gynaecol Res.* 2005; 31 (2): 178-84.
110. LEVY, J. A. Human immunodeficiency Virus. In: *The retroviridae*, LEVY J. A, editor New York: Plenum Press, 1995; p. 1-98.
111. LEWI, D. S.; TURCATO, Jr. G.; CASTELO, Filho A. *et al.* Síndrome de imunodeficiência adquirida. *Atualização Terapêutica.* São Paulo: Artes Médicas: 2003; p. 288-293.
112. LOPES, F.; LATORE, M. R.; CAMPOS PIGNATARI, A. C. *et al.* HIV, HPV, and syphilis prevalence in a women's penitentiary in the city of Sao Paulo, 1997-1998. *Cad Saude Publica* 2001; v. 17, n. 6, p. 1473-80.

113. LÖRINCZ, A. T.; RALPH, M.; RICHART, M. D. human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cytology in cervical screening programs. *Arch Pathol Lab Med* 2003; v. 127.
114. LUQUE, A. E.; DEMETER, L. M.; REICHMAN, R. C. Association of human papillomavirus infection and disease with magnitude of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA plasma level among women with HIV-1 infection. *J Infect Dis.* Washington, 1999; 179: 1405-9.
115. LUQUE, A. E.; JABEEN, M.; MESSING, S. *et al.* Prevalence of human papillomavirus genotypes and related abnormalities of cervical cytological results among HIV-1-infected women in Rochester, New York. *J Infect Dis.* 2006; 194 (4): 428-34.
116. LYONS, F.; PRENDIVILLE, W.; MULCAHY, F. Cervical disease. In: HIV-1-positive women: a review. *Intern J STD & AIDS* 2003; 15(2): 89-93.
117. MAIMAN, M.; FRUCHTER, R.; SEDLIS, A. *et al.* Prevalence, risk factors, and accuracy of cytologic screening for cervical intraepithelial neoplasia in women with the human immunodeficiency virus. *Gynecol Oncol.* 1998; 68(3): 233-9.
118. MAO, C.; KOUTSKY L.A.; AULT, K.A. *et al.* Efficacy of human papillomavirus-16 vaccine to prevent cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 2006; 107(1):18-27.
119. MARTIN, C. M.; ASTBURY, K.; O'LEARY, J. J. Molecular profiling of cervical neoplasia. *Expert Rev Mol Diagn.* 2006; 6: 217-229.
120. MASSAD, L. S.; RIESTER, K. A.; ANASTOS, K. M. *et al.* 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* 1999; 21:33-41.
121. MASSAD, L. S.; AHDIED, L.; BENNING, L. *et al.* Evolution of cervical abnormalities among women with HIV-1: evidence from surveillance cytology in the women's interagency HIV study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001; 27: 432-42.
122. MBULAITEYE, S. M.; BIGGAR, R. J.; GOEDERT, J. J. *et al.* Immune deficiency and risk for malignancy among persons with AIDS. *J Acquir Immunc Defic Syndr* 2003; 32: 527-33.
123. MEIJER, C. J. L. M.; SNIJDERS, P. J. F.; BRULE, A. Screening for cervical cancer: should we test for infection with high-risk HPV? *CMAJ.* 2000; 163: 535-8.
124. MEISELS A.; FORTIN R.; ROY M. Condylomatous lesions of the cervix and vagina, II Cytologic, colposcopic and histopathologic study. *Acta Cytol.* 1977; 21:379-90.
125. MELLIN, H.; FRIESLAND, S.; LEWENSOHN, R.; *et al.* Human papillomavirus

- (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. *Int J Cancer* 2000; 89: 300-304.
126. MERCK SHARP DOHME FARMACEUTICALS. Vacina quadrivalente recombinante contra papilomavírus humano (online). Disponível: <http://www.msdonline.com.br>
 127. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria Executiva. Controle do Câncer do Colo do Útero: Programa Nacional Controle do Câncer do Colo Uterino. Brasília (DF); 2001.
 128. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Recomendações para profilaxia da transmissão vertical do HIV e terapia anti-retroviral em gestantes. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 176 p. Disponível em: <www.aids.gov.br> Acesso em: 20 set. 2008.
 129. MINKOFF, H.; FELDMAN, J.; DEHOVITZ, J. *et al.* A longitudinal study of HPV carriage. In: HIV infected and HIV uninfected women. *Am J Obstet Gynecol.* Saint Louis. 1998; 178: 982-6.
 130. MODIS, Y.; TRUS, L. B.; HARRISON, S. T. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J.* 2002; 21: 4754-62.
 131. MORENO, V.; BOSH, F. X.; MUNOZ, N. *et al.*, and the International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study Group. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC, multicentric case-control study. *Lancet.* 2002; 359: 1085-1092.
 132. MOSCICKI, A.; ELLENBERG, J. H.; VERMUND, S. H. *et al.* Prevalence of and risks for cervical human papillomavirus infection and squamous intraepithelial lesions in adolescent girls. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2000; 154:127-134.
 133. MOSCICKI, A. B.; ELLENBERG, J. H.; FARHAT, S. *et al.* Persistence of human papillomavirus infection in HIV-infected and uninfected adolescent girls: risk factors and differences by phylogenetic type. *J Infect Dis* 2004; 190: 37-45.
 134. MOSCICKI, A.B.; SCHIFFMAN, M.; KJAER, S. *et al.* Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* 2005; 23: 2388-94.
 135. MUNOZ, N.; BOSCH, F. X.; DE SANJOSE, S. *et al.* The causal link between human papillomavirus and invasive caervical câncer: a population based case-control study in Colombia and Spain. *Int. J. Cancer* 1992; 5:743-749.
 136. MUNOZ, N.; FRANCESCHI, S.; BOSETTI, C. *et al.* and the International Agency for Research on Câncer. Multicentric Cervical Cancer Study Group. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet.* 2002; 359: 1093-1101.

137. MUNOZ, N.; BOSCH, F. X.; DE SANJOSE, S. *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518-27.
138. MUNOZ, N.; MENDEZ, F.; POSSO, H. *et al.* Incidence, duration and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis* 2004; 190: 2077-87.
139. MYCINTYRE-SELTMAN, K.; CASTLE, P. E.; GUIDO, R. *et al.* Smoking is a risk factor for cervical intraepithelial neoplasia grade 3 among oncogenic human papillomavirus DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14: 1165-1170.
140. MYERS, E. R.; MCCRORY, D. C.; NANDA, K. *et al.* Mathematical model for the natural history of human papillomavirus infection and cervical model for the natural history of human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. *Am J Epidemiol* 2000; 151: 1158-71.
141. NANDA, K.; MCCRORY, D. C.; MYERS, E. R. *et al.* Accuracy of the papanicolau teste in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med.* 2000; 132: 810-819.
142. NICOL, A. F.; FERNANDES, A. T. G.; ALMEIDA, M. G. B. Immune response in cervical dysplasia induced by human papillomavirus: the influence of human immunodeficiency virus-1 co-infection – review. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, February 2005; v. 100(1): 1-12.*
143. NOBBENHUIS, M. A. E.; WALBOOMERS, J. M. M.; HELMERHORST, T. J. M. *et al.* Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet.* 1999; 354: 20-25.
144. NONNENMACHER, B.; BREITENBACH, V.; VILLA, L. L. *et al.* Identificação do papilomavirus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. *Revista de Saúde Pública,* 2002; v. 36, n. 1, São Paulo.
145. NORONHA, V.; MELLO, W.; VILLA, L. L. *et al.* Papilomavírus humano associado a lesões de cérvix uterina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1999; 32(3) : 235-40.
146. NORONHA, V.; CRUZ, E. M.; NAUM-PINHO, C. *et al.* Papilomavírus humano em mulheres submetidas à colpocitologia oncótica. *DST- J. Bras. Doenças Sex. Transm.* 2006; 18(2): 130-136.
147. O'CONNOR, M.; APT, D.; BERNARD, H. U. DNA tumor virus: papiloma. *Encyclopedia of Cancer.* California: Academic Press, 1997; p. 520-31.
148. OLIVEIRA, L. H.; ROSA, M. L.; PEREIRA, C. K. *et al.* human papillomavirus status and cervical abnormalities in women from public and private health

care in Rio de Janeiro state, Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo, São Paulo 2006; v. 48, n. 5, p. 279-85.

149. PALEFSKY, J. M.; HOLLY, E. A.; GONZALES, J. *et al.* Detection of human papillomavirus DNA in anal intraepithelial neoplasia and anal cancer. Cancer Res. 1991; 51:1014-9.
150. PALEFSKY, J. M.; MINKOFF, H.; KALISH, L. A. *et al.* Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. J Natl Cancer Inst 1999; 91: 226-36.
151. PALEFSKY, J. M.; HOLLY, E. A.; RALSTON, M. L. *et al.* Prevalence and risk factors for anal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and high-risk HIV positive. J Infect Dis. 2001; 183(3): 383-91.
152. PALEFSKY, J. M.; HOLLY, E. A. Immunosuppression and co-infection. Journal of the National Cancer Institute monographs 2003; n 31
153. PALEFSKY, J. M. Cervical human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia in women positive for human immunodeficiency virus in the era of highly active antiretroviral therapy. Curr Opin Oncol 2003; 15: 382-8.
154. PALEFSKY, J. M. Biology of HPV in HIV infection. Adv. Dent. Res. 2006; 19: 99-105.
155. PALEFSKY J. M.; GILLISION M. L.; STRICKLER H.D. HPV vaccines in immunocompromised women and men. Vaccine 2006; 24 Suppl 3:S140-6.
156. PAN, W.; DATTA, A.; ADAMI, G. R. *et al.* Oncogene 2003; 22, 5496-5503.
157. PARKIN, D. M.; PISANI, P.; FERLAY, J. Global Cancer Statistics. Cancer J Clin 1999; 49: 33-64.
158. PARKIN, D. M.; BRAY, F.; FERLAY, J. *et al.* Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2005; 55: 74-108.
159. PAULO, M.; BORGES, A. B.; DUARTE, G. *et al.* The environmental cofactors in carcinogenesis in high risk HPV/HIV-positive women. The Brazilian Journal of Infectious Diseases 2007; 11(2): 189-195.
160. PENN, I. Cancers of the anogenital regions in renal transplant recipients. Analysis of 65 cases. Cancer 1986; 58: 611-616.
161. PENN, I. The changing pattern of post transplant malignancies. Transplant Proc 1991; 23 (1 Pt 2): 1101-1103.
162. PINTO, A. P.; TULIO, S.; CRUZ, O. R. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical. Rev. Assoc. Méd. Bras. São Paulo, 2002; 48(1): 73-8.

163. PLUMMER, M.; HERRERO, R.; FRANCESCHI, S. *et al.* Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case-control study. *Cancer Causes Control*. 2003; 14: 805-814.
164. POLJAK, M.; MARIN, I. J.; SEME, K. *et al.* Hybrid capture II HPV test detects at least 15 human papillomavirus genotypes not included in its current high-risk probe cocktail. *J Clin Virol* 25, 2002; (Suppl. 3), S89-S97.
165. QUEIROZ, C.; TRAVASSOS, A. G.; STUDART, E. *et al.* Prevalence of human Papilloma Virus in HIV-positive and HIV-negative patients in the State of Bahia. A pilot study. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2004; 8(5): 356-362.
166. RABELO-SANTOS, S.H.; ZEFERINO, L.; VILLA, L. L. *et al.* Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiânia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro 2003; v. 98(2): 181-184.
167. RACHID, M.; SCHECHTER, M. *Manual de HIV/AIDS*. 8. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2005; p. 1-224.
168. REID, R. Biology and colposcopic features of Human Papillomavirus-associated cervical disease. *Obstet Gynecol North Am*, New York, 1993; 20(1): 123-51.
169. REZNIKOFF, C. A.; YEAGER, T. R.; BELAIR, C. D. *et al.* *Cancer Res*. 1996; 56, 2886-2890.
170. RICHARDSON, H.; KELSALL, G.; TELLIER, P.; *et al.* The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; v. 12, n. 6, p. 485-90.
171. RIVOIRE, W; CAPP, E.; CORLETA, H. V. E. *et al.* Bases biomoleculares da oncogênese cervical. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2001; 47(2): 179-84.
172. RIVOIRE, W.; CAPP, E.; MONEGO, H. *et al.* Lesões de baixo e alto grau no colo uterino. In: FREITAS, F, cols. *Rotinas em ginecologia*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003; p. 261-72
173. ROWHANI-RAHBAR, A.; HAWES, S. E.; SOW, P; S. *et al.* The impact of HIV status and type on the clearance of human papillomavirus infection among senegalese women. *JID* 2007; 196.
174. SANTOS, A. M.; FERNANDES, A.; ANTONIO, D. G. *et al.* Conhecimento, atitudes e práticas de mulheres brasileiras atendidas pela rede básica de saúde com relação às doenças de transmissão sexual. *Cadernos de Saúde Pública* 2000; 16: 1-7.
175. SCHEFFNER, M.; WERNESS, B. A.; HUIBREGTSE, J. M. *et al.* The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the

ubiquitination of p53. *Cell*. 1993; 75:495-505.

176. SCHIFFMAN, M.H. ; BAUER, H. M. ; LORINCZ, A. T. *et al.* Comparison of southern blot hybridization and polymerase chain reaction methods for the detection of human papillomavirus DNA. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 573-7.
177. SCHIFFMAN, M. H. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst*, 1992; v. 84, n. 6, p. 394-8.
178. SCHIFFMAN, M.; H. M. Bauer; R. Hoover; A. G. Glass; D. M. Cadell; B. B. Rush; D. R. Scott; M. Sherman; R. Kurman; S. Wacholder; C. K. Stanton; M. M. Manos. Epidemiologic evidence showing the HPV infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* 1992; 85: 958-964
179. SCHIFFMAN, M. H. Epidemiology of cervical human papillomaviruses. In: ZUR, Hausen H. ed. *Human Pathogenic Papillomaviruses*. Heidelberg: Springer-Verlag, 1994.
180. SCHIFFMAN, M.; SOLOMON, D. Findings to date from the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS). *Arch Pathol Lab Med*. 2003; 127: 946-949.
181. SCHIFFMAN, M.; HERRERO, R.; DESALLE, R. *et al.* The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral *evolution*. *Virology* 2005; 337: 76-84.
182. SCOTT, M.; NAKAGAWA, M.; MOSCICKI, A. B. Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001; 8: 209-220.
183. SEKARIC, P.; SHAMANIN, V. A.; LUO, J. *et al.* *Oncogene*, 2007; 26, 6261.
184. SHAH, K. V.; SOLOMON, L.; DANIEL, R. *et al.* Comparison of PCR and hybrid capture methods for detection of human papillomavirus in injection drug-using women at high risk of human immunodeficiency virus infection. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35: 517-519.
185. SCHUMAN, P.; OHMITE, S. E.; KLEIN, R. S. *et al.* Longitudinal study of cervical squamous intraepithelial lesions in human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and at risk HIV-seronegative women. *J Infect Dis* 2003; 188: 128-36.
186. SILVA, A.; AMARAL, M.; CRUZ, A. O papel do Papiloma Vírus Humano na Carcinogênese. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* n.29, 2003.
187. SIX, C.; HEARD, I.; BERGERON, C. *et al.* Comparative prevalence, incidence, and short-term prognosis of cervical squamous intraepithelial lesions amongst HIV-positive and HIV-negative women. *AIDS* 1998; 12:1047-1056.
188. SKYLDBERG, B.; FUJIOKA, K.; HELLSTROM, A. C. *et al.* Human

papillomavirus infection, centrosome aberration, and genetic stability in cervical lesions. *Mod Pathol* 2001; 14:279-284.

189. SMITH, E. M.; JOHNSON, S. R.; RITCHIE, J. M. *et al.* Persistent HPV infection in postmenopausal women. *Int J Gynaecol Obstet*, 2004; v. 87, n. 2, p. 131-7.
190. SOLOMON, D; NAYAR, R. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: definitions, criteria and explanatory notes. New York, Springer-Verlag, 2004.
191. SOPER, D. Reducing the health burden of HPV infection through vaccination. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2006; 14(1): 83084.
192. SOTO, U.; DENK, C.; LENGERT, M. *et al.* *Int. J. Cancer*, 2000; 86, 811-817.
193. SOUZA, N. S. T. Diagnóstico da infecção pelo HPV em lesões do colo do útero em mulheres HIV: acuidade da histopatologia. *RBGO 2001*; v. 23, n. 6.
194. SOUZA, E. P. Epidemiologia da infecção genital por HPV e anormalidades na citologia cervical em mulheres jovens brasileiras. 2004. 151 f. Tese (Doutorado em Tocoginecologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2004.
195. SPINILLO, A.; ZARA, F.; GARDELLA, B. *et al.* Cervical intraepithelial neoplasia and cervicovaginal shedding of human immunodeficiency virus. *Obstet Gynecol*. 2006; 107 (2 Pt 1): 314-20.
196. STEVENS, L.M. Papillomavirus. *The Journal of the American Medical Association* 2002; 287 (18): 24-52
197. STOLER, M. H.; SCHIFFMAN, M. Interobserver reproducibility of cervical cytology and histologic interpretations: realistic estimates from ASCUS-LSIL triage study. *JAMA*, 2001; v. 285, p. 1500-5.
198. STOREY, A.; THOMAS, M.; KALITA, A. *et al.* Role of p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature*, 1998.
199. STRICKLER, H. D.; PALEFSKY, J. M.; SHAN, K. V. *et al.* Human papillomavirus type 16 and immune status in human immunodeficiency virus-seropositive women. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1062-71.
200. STRICKLER, H. D.; BURK, R. D.; FAZARRI, M. *et al.* Natural History and possible reactivation of human papillomavirus in human immunodeficiency virus-positive women. *Journal of the National Cancer Institute* 2005; v. 97, n. 8.
201. SUN, X.; ELLERBROCK, T. V.; LUNGU, O. *et al.* Human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-seropositive women. *Obstet Gynecol* 1995; 85: 680-6.

202. SUN, X.; KUHN, L.; ELLERBROCK, T. V.; CHIASSON, M. A. *et al.* Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med.* 1997; 337: 1343-1349.
203. SYRJÄNEN, K. J.; SYRJÄNEN, S. M. Papillomavirus infections in human pathology. John Wiley & Sons Ltda, 2000.
204. TORNESELLO, M. L.; DURATURO, M. L.; GIORGI-ROSSI, P. *et al.* Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants in human immunodeficiency virus-positive italian women. *Journal of General Virology* 2008; 89, 1380-1389.
205. TROTTIER, H.; FRANCO, E. L. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*, 2006; v. 24, supl. 1, p. S1-15.
206. TWEDDEL, G.; HELLER, P.; CUNNANE, M. *et al.* The correlation between HIV seropositivity, cervical dysplasia, and HPV subtypes 6/11, 16/18, 31/33/35. *Gynecol Oncol* 1994; 52: 161-4.
207. VAN DER GRAAF, Y.; MOLIJN, A.; DOORNEWAARD, H. *et al.* Human papillomavirus and the long-term risk of cervical neoplasia. *Am J Epidemiol* 2002; 156:158-64.
208. VERNON, S. D.; REEVES, W. C.; CLANCY, K. A. *et al.* a longitudinal study of human papillomavirus Dna detection in human immunodeficiency virus type 1-seropositive and – seronegative women. *J Infect Dis.* 1994; 169: 1108-1112.
209. VILLA, L. L. Human papillomaviruses and cervical cancer. *Adv Cancer Res.* 1997; 71: 321-341.
210. VILLA, L. L.; BERNARD, H. U.; KAST, M. *et al.* Past, present, and future of HPV research: highlights from the 19th International Papillomavirus Conference-HPV. *Virus Res* 2001; 89: 163-173.
211. VILA, L.L. Prophylactic HPV vaccines: reducing the burden of HPV-related diseases. *Vaccine* 2006; 24: S23-8.
212. WAGGONER, S. E. Cervical câncer. *Lancet* 2003; 361: 2217-2225.
213. WALBOOMERS, J. M.; JACOBS, M. V.; MANOS, M. M. *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 1999 ; v. 189, n. 1, p. 12-9.
214. WARD, K.; WINTER, P. C.; WALSH, M. *et al.* Detection of human papillomavirus by the polymerase chain reaction in histologically normal penile skin adjacent to penile warts. *Sex Transm Dis.* 1994; 21: 83-8.
215. WEAVER, B. A. Epidemiology and natural history of genital human papillomavirus infection. *J Am Osteopath Assoc.* 2006; 106 (3 Suppl 1): S2-8.

216. WEISSENBORN, S. J.; FUNKE, A. M.; HELLMICH, M. *et al.* Oncogenic human papillomavirus DNA loads in human immunodeficiency virus-positive women with high-grade cervical lesions are strongly elevated. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41: 2763-2767.
217. WIELAND, U.; PFISTER, H. Papillomavirus em patologia humana: epidemiologia, patogênese e papel oncogênico. In: GROSS, G.; BARRASSO, R. editores. Infecções por papillomavirus humano. Atlas clínico de HPV. 1ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1999; p. 1-18.
218. WIELAND, U.; JURK, S.; WEISSENBORN, S. *et al.* Erythroplasia of queyrat: coinfection with cutaneous carcinogenic human papillomavirus type 8 and genital papillomaviruses in a carcinoma in situ. *J. Investig. Dermatol.* 2000; 115: 396-401.
219. WILEY, D.; MASONGSONG, E. Human papillomavirus: the burden of infection. *Obstet Gynecol Surv.* 2006; 61 (6 Suppl 1): S3-14.
220. WINER, R. L.; LEE, S. K.; HUGHES, J. P. *et al.* Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol*, 2003; v. 157, n. 3, p. 218-26.
221. WOMACK, S. D.; CHIRENJE, Z. M.; GAFFIKIN, L. *et al.* HPV-based cervical cancer screening in a population at high risk for HIV infection. *Int. J. Cancer* 2000; 85: 206-210.
222. WOODMAN, C. B.; COLLINS, S.; WINTER, H. *et al.* Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet*, [S.1], v. 357, n. 9271, p. 1831-6, jun. 2001.
223. WOODMAN, C. B.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7 (1): 11-22.
224. WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Comprehensive cervical cancer control: a guide to essential practice. Geneva, Switzerland: Who, 2006.
225. WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. HPV information Centre www.who.int/statistics/dynamic/ico/SummaryReportsSelect.cfm, acessado em 30 de outubro de 2008.
226. WRIGHT, T. C. Jr.; SUN, X. W. Anogenital papillomavirus infection and neoplasia in immune odeficient women. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1996; 23: 861-93.
227. WRIGHT, T. C. Jr; SUBBARAO, S., ELLERBROCK, T.V. *et al.* Human immunodeficiency virus 1 expression in the female genital tract in association with cervical inflammation and ulceration. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184:279-85
228. ZIMMERMMANN, J. B.; MELO, V. H. Prevalência dos genótipos do

papillomavirus humano na cérvix uterina de pacientes infectadas com o vírus da imunodeficiência humana e suas associação com o grau das lesões do colo uterino. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2002; 24(6): 419.

229. ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta.* 1288, p. 55-78, 1996.
230. ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*, 2000; v. 92. n. 9, May 3.
231. ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 342-50.
232. ZUR HAUSEN, H. *Infections Causing Human Câncer*, Wiley-VCH, Weinheim-New York, 2006; pp. 1-517.
233. ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses – to vaccination and Beyond. *Biochemistry (Moscow)*, 2008; v. 73, n. 5 p. 498-503.

ANEXOS

ANEXO 1- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

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

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

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

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

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

Pesquisador Responsável: Vera Aparecida Saddi (CPF:170090061-72)

Pesquisadores participantes: Luciana Pinheiro Vaz (CPF:776530091-15)

Fernanda Cristina de Lima (CPF:003356891-08)

Silvia Helena Rabelo (CPF:375166551-04)

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

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

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus DNA transmitido sexualmente, sendo aceito como o agente etiológico central na gênese de tumores cervicais, pois mais de 90% desse tipo de câncer apresenta DNA do HPV (Palefsky *et al.*, 2003). As infecções por HPV estão associadas com lesões cutâneas e do epitélio mucoso. Mais de 100 tipos diferentes de HPVs já foram identificados, dos quais 40 tipos foram detectados em carcinomas cervicais e suas lesões precursoras, as denominadas lesões intraepiteliais escamosas (SIL) (Levi *et al.*, 2002), comumente classificadas como lesões de baixo risco (LSIL) e lesões de alto risco (HSIL).

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

O presente estudo pretende detectar o DNA do HPV e os genótipos do HPV-16 e HPV-18, em amostras cervicais, através da técnica de PCR, em mulheres HIV-positivas e mulheres HIV-negativas na cidade de Goiânia –GO.

Objetivo: Comparar a prevalência das infecções pelo HPV e seus possíveis fatores de risco entre mulheres HIV-positivas e HIV-negativas, na cidade de Goiânia-GO. A detecção do genoma viral será realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR), com *primers* genéricos GP5+/GP6+ e *primers* específicos para a genotipagem do HPV-16 e HPV-18.

Metodologia: As mulheres HIV-positivas serão submetidas semestralmente à contagem de células linfocitárias do tipo CD4 e CD8, pelo método de citometria de fluxo e avaliação da carga viral, pelo método NASBA, como parte da rotina assistencial. Após concordarem em participar do projeto, as pacientes deverão assinar o termo de consentimento livre e esclarecido e responder um questionário. As mulheres que atenderem ao convite serão

incluídas no estudo e submetidas à coleta de material cérvico-vaginal para exame citológico e molecular.

No Laboratório da Área da Saúde (LAS) da Universidade Católica de Goiás e no CADA, em Goiânia, as mulheres soronegativas e as soropositivas para o HIV, respectivamente, serão submetidas ao exame clínico cuidadoso, com inspeção dos genitais externos e da região perianal. A seguir, com uma espátula de Ayre será coletado material de fundo de saco vaginal e da ectocérvice. Utilizando uma escova de *cytobrush*, com um diâmetro 5 a 8 mm, será coletado material da endocérvice (com seis movimentos rotatórios) para exame citopatológico, realizado pelo método convencional e detecção de HPV. Após a confecção das lâminas, as escovas serão mergulhadas em uma solução-tampão preservadora (UCM– Roche) para posterior pesquisa de DNA de HPV e genotipagem, pelo método de PCR. Quando indicados, exames colposcópicos com ácido acético a 3% e biópsia do colo do útero poderão ser realizados. Após o diagnóstico, as pacientes poderão ser atendidas no ambulatório de ginecologia da Santa Casa de Misericórdia ou do Hospital de Doenças Tropicais, com seguimento apropriado e/ou tratamento.

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

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

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

Vera Aparecida Saddi e/ou Luciana Pinheiro Vaz

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

Local e data _____

Nome e Assinatura do sujeito ou responsável: _____

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

Testemunha (não ligada à equipe de pesquisadores):

Nome: _____ Assinatura: _____

ANEXO 2 – Questionário

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

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

Nome: _____ Data de Nascimento: ____/____/____
Endereço: _____
_____ Telefone _____
Naturalidade: _____ Procedência: _____
Profissão: _____ Estado Civil: _____
Escolaridade: _____ Renda mensal: _____
Raça/Cor: _____ Paridade: G:_____/P:_____/A:_____
Idade à primeira relação sexual: _____ Número de parceiros: _____
Uso de drogas ilícitas _____
Tabagismo (1) _____ Etilismo _____
Uso de preservativos: (1) Frequentemente (2) Ocasionalmente (3) Raramente (4) Nunca
Data do último exame ginecológico ____/____/____ Local: _____
História de prostituição _____ Contato homossexual: _____
Já recebeu transfusão sanguínea? _____ Quando? ____/____/____
Data do diagnóstico da AIDS ____/____/____ Local: _____
Último exame CD4+/CD8+: ____/____/____ Último exame de carga viral do HIV ____/____/____
Estágio clínico da infecção pelo HIV _____
Sintomas relacionados ao HIV _____ Hospitalizações? _____
Prescrição de drogas antiretrovirais _____
Tratamento: Início em: ____/____/____
Protocolo: _____ Regime: _____
Data da coleta: ____/____/____

ANEXO 3 - Protocolo para PCR de GAPDH e GP5+/GP6+

Protocolo para PCR de GAPDH

Reagentes	Concentração inicial	Volume para 1 reação
H2O	ultra pura	15,75 µl
Tampão	10 X	2,5 µl
MgCl ₂	50mM	1,0 µl
dNTP	2mM/cada	2,5 µl
P1 (f)1	2,5 µM	1,0 µl
P2 (f)2	2,5 µM	1,0 µl
Enzima Taq	5U/µl	0,25 µl
DNA	0,5 ng/µl	1,0 µl
Volume Total		25 µl

Protocolo para PCR de GP5+/GP6+

Reagentes	Concentração inicial	Volume para 1 reação
H2O	ultra pura	10,5 µl
Tampão	10 X	2,5 µl
MgCl ₂	50mM	1,75 µl
dNTP	2mM/cada	5,0 µl
<i>Primer 1 GP5+</i>	2,5 µM	2,0 µl
<i>Primer 2 GP6+</i>	2,5 µM	2,0 µl
Enzima Taq	5U/µl	0,25 µl
DNA	0,5 ng/µl	1,0 µl
Volume Total		25 µl

ANEXO 4 - Protocolo para PCR de HPV-16 e HPV-18

Protocolo para PCR de HPV-16

Reagentes	Concentração inicial	Volume para 1 reação
H2O	ultra pura	13,75 µl
Tampão	10 X	2,5 µl
MgCl ₂	50mM	0,75 µl
dNTP	2mM/cada	2,5 µl
<i>Primer 1</i>	2,5 µM	2,0 µl
<i>Primer 2</i>	2,5 µM	2,0 µl
Enzima Taq	5U/µl	0,5 µl
DNA	0,5 ng/µl	1,0 µl
Volume Total		25 µl

Protocolo para PCR de HPV-18

Reagentes	Concentração inicial	Volume para 1 reação
H2O	ultra pura	15,25 µl
Tampão	10 X	2,5 µl
MgCl ₂	50mM	1,25 µl
dNTP	2mM/cada	2,5 µl
<i>Primer 1</i>	2,5 µM	1,0 µl
<i>Primer 2</i>	2,5 µM	1,0 µl
Enzima Taq	5U/µl	0,5 µl
DNA	0,5 ng/µl	1,0 µl
Volume Total		25 µl

ANEXO 5 - Gel de Poliacrilamida a 8% e coloração do gel por nitrato de prata

Gel de Poliacrilamida a 8%

Todos os produtos de PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida a 8% e posteriormente corados com Nitrato de Prata.

O gel de poliacrilamida 8% foi preparado com 34 ml de água destilada e deionizada, 10 ml de solução de acrilamida 40%, 5 ml de TBE (tampão Tris-Borato-EDTA) 10 X concentrado. Para a polimerização foi adicionado 500 μl de persulfato de amônio a 10% e 50 μl de TEMED (tetrametiletilenodiamina).

As amostras e controles negativo e positivo foram preparadas com 10 μl do produto de amplificação, acrescido de 3 μl do tampão de corrida. Como marcador de peso molecular foi utilizado o LADDER de 50 pb. O marcador de peso molecular foi preparado com 5 μl do LADDER, acrescido de 3 μl de água milliQ e 3 μl do tampão de amostra.

Após a polimerização foram aplicados em gel cerca de 10 μl de todas as amostras. Em seguida o gel foi submetido à eletroforese, na fonte de tensão, com voltagem constante de 150 V e 150 A por 1 hora e 15 minutos, utilizando-se como tampão de corrida TBE 1X concentrado, pH 8,3.

Coloração do gel por nitrato de prata AgNO_3

Utilizamos o protocolo de coloração rápida pela prata. Solução de Fixação: 50 mL de álcool etílico P.A., 2 mL de ácido acético, água deionizada q.s.p. 300 mL. Solução de coloração: Nitrato de Prata 15%. Solução de revelação: 15 mL de hidróxido de sódio 30%, 2 mL de formaldeído 37% e água deionizada q.s. p. 200mL. O gel era depositado em um recipiente de plástico limpo, no qual eram adicionados 150mL da solução de fixação, 2 mL de solução de coloração, agitando por 5 minutos. A Solução de Fixação era desprezada e o gel lavado com água deionizada, por 15 segundos (repetir este procedimento por duas vezes);

A solução de revelação era adicionada juntamente com 2 mL de formaldeído a 37% (no momento do uso), homogeneizando e a mistura agitada lentamente até a revelação das bandas. Em seguida era adicionado o restante da solução de fixação e o gel era colocado no secador a vácuo durante 1 hora e 45 minutos a 60°C.

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](#)