



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Campus de São José do Rio Preto

**Programa de Pós Graduação em Microbiologia**

Renata Prandini Adum de Matos

**Análise do Gene E6 de HPV de Baixo Risco em Papilomatose  
de Laringe**

São José do Rio Preto  
2013

Renata Prandini Adum de Matos

**Análise do Gene E6 de HPV de Baixo Risco em Papilomatose de  
Laringe**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Marília de Freitas Calmon

Co-orientadoras: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Rahal

Dr<sup>a</sup>. Laura Sichero

São José do Rio Preto  
2013

Matos, Renata Prandini Adum de.

Análise do Gene E6 de HPV de Baixo Risco em Papilomatose de Laringe / Renata Prandini Adum de Matos. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2013.

72 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Marília de Freitas Calmon

Co-orientador : Laura Sichero

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1.Papilomatose Respiratória Recorrente. 2.HPV. 3. Variabilidade Genética. I. Calmon, Marília de Freitas. II. Sichero, Laura. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 575.86

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

Renata Prandini Adum de Matos

Análise do Gene E6 de HPV de Baixo Risco em Papilomatose de  
Laringe

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Dr<sup>a</sup>. Marilia de Freitas Calmon  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientadora

Dr<sup>a</sup>. Isabel Maria Vicente Guedes de Carvalho-Mello  
UNIFESP – São Paulo

Prof. Dr. Enrique Mario Boccardo Pierulivo  
USP- São Paulo

São José do Rio Preto  
28 de fevereiro de 2013

*Dedico este trabalho...*

À minha família!

Dedico aos meus pais José Maria e Cláudia por todo apoio e carinho. Obrigado Pai e Mãe por todos os sacrifícios que fizeram para que eu tivesse uma boa educação.

Dedico também a minha querida irmã, por ser também minha melhor amiga, sempre torcendo por mim e fazendo suas promessas malucas para que tudo desse certo.

Amo vocês!

## Agradecimentos

- Às minhas orientadoras Dra. Marília de Freitas de Calmon e Profa. Dra. Paula Rahal, pela amizade e dedicação e por todos os ensinamentos. Vocês ajudaram a me tornar uma profissional melhor, mas também me ensinaram a ser uma pessoa melhor. Obrigado por me acolherem e me apoiarem e acreditarem em mim.
- À minha co-orientadora Laura Sichero, por toda a dedicação com esse trabalho. Ele não seria o mesmo sem o seu toque especial.
- Ao Dr. Rodrigo Lacerda Nogueira, por fornecer as amostras necessárias para este trabalho.
- À Caroline Measso do Bonfim, por ser a minha “colega do HPV” e por toda ajuda e amizade que foi essencial para a conclusão deste trabalho.
- À Cintia Bittar, pela ajuda nas análises filogenéticas e por ser essa pessoa tão especial que contagia alegria por onde passa.
- À Ana Carolina Gomes Jardim, por ter me iniciado na vida científica. Obrigado por tudo que você me ensinou.
- A todos os companheiros do Laboratório de Estudos Genômicos: Paola, Marina, Natalia, Lilian, Ana Claudia, Bruno, André, Bruna, Mariana, Henrique, Tasso, Ana Beatriz, Guilherme, Jaqueline, Rodolfo, Marina, Lucas. Obrigado a todos pela amizade, conversas e risadas.
- À Lenira, pela amizade e carinho e pelo seu papel fundamental na vida de todos no laboratório.
- Ao meu namorado Douglas, por ser essa pessoa tão importante na minha vida. Obrigado por me fazer rir quando mais nada consegue, por me acalmar, por me aceitar e estar ao meu lado em todos os momentos. Não teria chegado até aqui sem você.
- A todos os meus professores do Curso de Ciências Biológicas, pelo papel fundamental na minha formação.

- Aos professores do Programa de Pós Graduação em Microbiologia, pelos ensinamentos.
- Ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia, pela disponibilidade e apoio.
- Ao Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas e ao Laboratório de Estudos Genômicos, pela infraestrutura, sem a qual esse trabalho não seria possível.
- A CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.
- À Deus.

*“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver”*

*Dalai Lama*



## Resumo

A Papilomatose Respiratória Recorrente (PRR) é uma doença caracterizada pela presença de tumores benignos no trato respiratório superior, sendo a laringe o sítio de lesão mais comum. Esta doença tem uma distribuição de idade bimodal, permitindo sua classificação em papilomatose juvenil ou adulta. O principal agente etiológico da PRR é o Papilomavírus Humano (HPV), um grupo de vírus de DNA, dos quais mais de 150 tipos já foram identificados. HPV-6 e HPV-11 são os tipos mais encontrados em PRR. Há poucos estudos sobre a distribuição das variantes moleculares de HPV de baixo risco. Desta maneira, o objetivo deste estudo foi avaliar a variabilidade genética do gene E6 entre isolados de HPV-6 e HPV-11 detectados em amostras de papilomatose respiratória recorrente (PRR) obtidas em uma coorte de pacientes brasileiros. A fim de comparar as sequências de nucleotídeos identificados em nosso estudo com isolados previamente reportados provenientes de outras partes do mundo, e de diferentes sítios anatômicos (papilomatose de laringe, verrugas genitais, câncer cervical e esfregaço anal), foi realizada a análise filogenética para determinar as relações filogenéticas das variantes detectadas no Brasil com as variantes isoladas em outras regiões do mundo. A região codificante completa do gene E6 de 25 amostras foi clonada e sequenciada. Em 18 isolados foi detectado o DNA do HPV-6 (72%), e em 7 isolados o DNA do HPV-11 (28%). Um total de quatro variantes genômicas diferentes de HPV-6 e duas variantes genômicas de HPV-11 foram identificadas e nenhuma variante pode ser associada com o quadro clínico do paciente. Para a reconstrução filogenética foram utilizadas as sequências de E6 detectadas neste estudo adicionalmente às sequências anteriormente publicadas originárias da Eslovênia e da África do Sul. Devido ao pequeno número de amostras não foi possível relacionar as variantes com sítios específicos de infecção e a análise filogenética de HPV-6 e HPV-11 revelou que as sequências não se agruparam de acordo com sua origem geográfica. Assim, não foi possível estabelecer uma associação geográfica entre as variantes de HPV-6 ou HPV-11, ao contrário do observado em HPV-16 e HPV-18.

**Palavras chave:** Papilomatose respiratória recorrente, HPV-6, HPV-11, variabilidade genética, análise filogenética.

## Abstract

Recurrent respiratory papillomatosis (RRP) is a disease characterized by benign neoplasms and can occur anywhere within the upper respiratory tract, but the most common lesion site is the larynx. This disease has a bimodal age distribution which forms the basis of its classification as juvenile or adult. The main etiological agent of RRP is *Human Papillomavirus virus* (HPV), a group of DNA virus with more than 150 identified types. HPV-6 and 11 are the most common types identified in RRP. There are few studies about the distribution of natural molecular variants of low-risk HPVs. So, the aim of this study was to evaluate the *E6* early gene variability among HPV-6 and HPV-11 isolates detected in recurrent respiratory papillomatosis (RRP) samples obtained in a cohort of Brazilian patients. In order to compare nucleotide sequences identified in our study with previously reported sequences isolates from different anatomic sites (laryngeal papillomas, genital warts, cervical cancer and anal swabs) obtained from other parts of the world was performed phylogenetic analysis to determine the phylogenetic relationships of variants detected in Brazil with variants isolated in others regions of world. The complete coding region of the *E6* gene of 25 samples were cloned and sequenced. HPV-6 DNA was detect in 18 isolates (72%) and HPV-11 DNA in 7 isolates (28%). A total of four different HPV-6 genomic variants and two HPV-11 genomic variants were identified and any variant could not be associated with the clinical outcome. Phylogenetic trees for both HPV types were reconstructed enclosing *E6* sequences detected in our study in addition to formerly published sequences from Slovenia and South Africa. The small number of samples analyzed prevents the evaluation of the association between specific molecular variants and the anatomical site of infection and the phylogenetic analysis of HPV-6 and HPV-11 revealed that the sequences did not group according to their geographical origin. We could not establish a geographical association between HPV-6 or HPV-11 variants, unlike HPV-16 and HPV-18.

**Keywords:** Respiratory Recurrent Papillomatosis, HPV-6, HPV-11, genetic variability, phylogenetic analysis.

## **Lista de Figuras**

<b>Figura 1.</b> Representação dos órgãos do trato respiratório humano.....	15
<b>Figura 2.</b> Árvore filogenética da Família Papillomaviridae.....	22
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática do genoma do Papilomavírus Humano.....	23
<b>Figura 4.</b> Ranking dos cinco tipos de HPV mais comuns dentro das regiões do mundo.....	27
<b>Figura 5.</b> Arquitetura celular do epitélio escamoso estratificado e a expressão das proteínas do HPV após a infecção.....	29
<b>Figura 6.</b> Genotipagem do HPV por RFLP.....	43
<b>Figura 7.</b> Produto amplificado correspondente a região genômica E6.....	45
<b>Figura 8.</b> Variabilidade genética do gene E6.....	46
<b>Figura 9.</b> Árvore Filogenética das variantes de HPV-6.....	49
<b>Figura 10.</b> Árvore Filogenética das variantes de HPV-11.....	50

## **Lista de Tabelas**

<b>Tabela 1.</b> Relação das enzimas de restrição e a composição química de cada tampão.....	35
<b>Tabela 2.</b> Sequência dos iniciadores específicos utilizados nas reações de amplificação do gene E6 do HPV.....	36
<b>Tabela 3.</b> Caracterização das amostras.....	41

## Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

**A** - Variante Asiático

**AA** - Variante Asiático–Americano

**Af** - Variante Africano

**BLAST** - *Basic Local Alignment Search Tool* (Ferramenta básica de alinhamento local)

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**DNA** - ácido desoxirribonucleico

**dNTPS** - Desoxinucleotídeos trifosfatos

**E** - Variante Europeu

**EDTA** - Ácido etilenodiamino-tetracético

***E. coli.*** - *Escherichia coli*

**GenBank** – Banco de dados de sequências do Centro de Informação sobre Biotecnologia Nacional

**HPV** - *Human Papillomavirus* (Papilomavírus humano)

**HCl** - Ácido Clorídrico

**IARC** – *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer)

**INCA** - Instituto Nacional do Câncer

**LB** – Luria-Bertani broth

**LCR** - *Long Control Region* (Região Longa de Controle)

**KCl** - Cloreto de potássio

**M** - Molar

**M** – Masculino

**MgCl<sub>2</sub>** - Cloreto de Magnésio

**MgSO<sub>4</sub>** - Sulfato de Magnésio

**mg** - Miligrama

**ml** – Mililitro

**mM** – milimolar

**mRNA** – Ácido ribonucleico mensageiro

**NaCl** - Cloreto de Sódio

**NCBI** - *National Center for Biotechnology Information* (Centro de Informação sobre Biotecnologia Nacional)

**ng** - Nanograma

**NIC** - Neoplasia Intra-Epitelial Cervical

**nm** - Nanometro

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

**pb** - pares de bases

**PA** - Pará

**PCR** - *Polimerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

**pmol** - picomol

**PRR** - Papilomatose Respiratória Recorrente

**PV** – Papilomavírus

**RFLP** - *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Polimorfismo do Tamanho de Fragmentos de Restrição)

**rpm** - Rotações por minuto

**TAE** - Tris-acetato e EDTA

**tRNA** - Ácido ribonucleico transportador

**URR** – *Upstream regulatory region* (Região regulatória superior)

**VLP** - *Virus Like Particle* (Partícula Semelhante a Vírus)

**µg** - Micrograma

**µL** – Microlitro

## Sumário

1. Introdução .....	15
1.1. Papilomatose Respiratória Recorrente .....	15
1.1.1. Transmissão.....	18
1.1.2. Tratamento .....	19
1.2. Papilomavírus Humano .....	21
1.2.1. Taxonomia.....	21
1.2.2. Biologia do Papilomavírus Humano .....	22
1.2.3. Diversidade genética do vírus.....	24
1.2.4. O Ciclo de infecção viral.....	28
1.2.5. A proteína E6 .....	30
2. Justificativa.....	31
3. Objetivos.....	33
4. Material e Métodos.....	34
4.1. População e amostra .....	34
4.2. Aspectos Éticos .....	34
4.3. Extração de DNA.....	34
4.4. Amplificação do gene endógeno GSTP1 .....	35
4.5. Detecção do HPV e Genotipagem.....	35
4.6. Amplificação da E6 e detecção dos produtos Amplificados.....	36
4.7. Purificação dos Fragmentos Amplificados.....	37
4.8. Clonagem.....	38
4.9. Sequenciamento.....	39
4.10. Análises das Sequências .....	39
4.11. Análise <i>in silico</i> da estrutura secundária.....	40
4.12. Análise Filogenética .....	40
5. Resultados .....	41
5.1. Caracterização das amostras.....	41
5.2. Detecção de HPV e Genotipagem.....	43
5.3. Amplificação de E6 .....	44
5.4. Variantes Genômicas da região E6 .....	45
5.5. Análise da estrutura secundária.....	47
5.6. Análise Filogenética .....	47
5.6.1. HPV-6.....	47

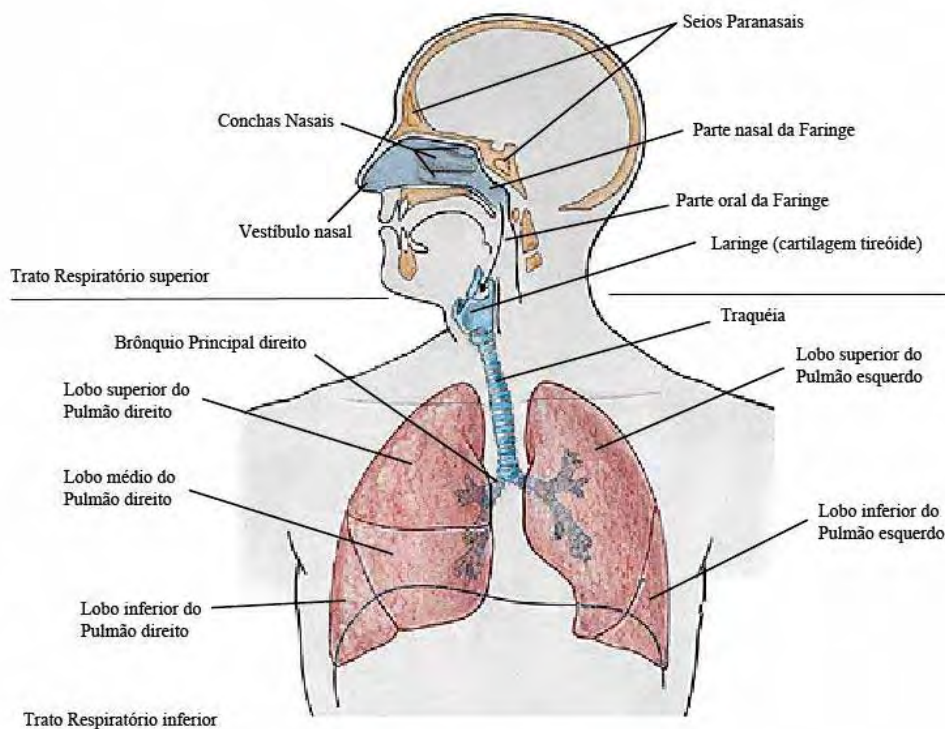
5.6.2. HPV-11.....	48
6. Discussão.....	51
7. Conclusões.....	56
8. Referências Bibliográficas .....	57



## 1. Introdução

### 1.1. Papilomatose Respiratória Recorrente

A Papilomatose respiratória recorrente (PRR) é uma doença benigna do trato respiratório superior, que ocorre principalmente na laringe (Figura 1). A PRR é caracterizada por tumores benignos solitários ou múltiplos que podem recorrer e atingir todo o trato respiratório (MOUNTS e KASHIMA, 1984). As lesões geralmente ocorrem em locais de constrição das vias aéreas, secagem ou oxigenação. Os locais de junção do epitélio respiratório e escamoso, como a superfície inferior das cordas vocais, o vestíbulo nasal e a superfície nasofaríngea do palato mole são especialmente vulneráveis e o número de locais afetados pode aumentar com a duração da doença (KASHIMA et al., 1993).



**Figura 1:** Representação dos órgãos do trato respiratório humano. A figura divide-se em trato respiratório superior e trato respiratório inferior. Fonte: <http://pt.scribd.com/doc/11128603/Apostila-Anatomia-Sistema-Respiratorio>

Esta doença foi descrita no final de 1800 por Sir Morrell Mackenzie, que reconheceu os papilomas como uma lesão distinta observada em laringe de crianças (GOON et al., 2008). Com o advento das técnicas modernas de genética molecular na década de 1990, o

Papilomavírus Humano (HPV) foi confirmado como o agente etiológico da PRR (DICKENS et al., 1991), sendo causada principalmente a pelos HPVs dos tipos 6 e 11, os mesmos tipos responsáveis pela formação das verrugas genitais (WELLER e STANBERRY, 2007).

A PRR é categorizada em juvenil e adulta, sendo esta classificação baseada no diagnóstico antes ou depois dos 12 anos de idade, respectivamente. A doença tem sido observada em pacientes no período pós-natal imediato e em pacientes com mais de 84 anos (DERKAY, 1995; 2001). A grande maioria dos pacientes com papilomatose juvenil (75% dos casos) é diagnosticada com cinco anos de idade, sendo a disfonia o sintoma mais comum (COHN et al., 1981; WETMORE et al., 2012). Crianças diagnosticadas em uma idade precoce apresentam um risco maior de progressão da doença em comparação com crianças diagnosticadas em idade mais avançada (BUCHINSKY et al., 2008).

Os dados de incidência e prevalência da PRR ao redor do mundo são imprecisos, por isso diversos estudos estão sendo realizados para esclarecer a real incidência da doença (LARSON e DERKAY, 2010). Reeves et al. (2003) analisaram o registro nacional de papilomatose juvenil nos Estados Unidos entre os anos de 1996 até 2002 e estimaram uma incidência de 1,7 a 4,3 para cada 100.000 crianças e de 1,8 a cada 100.000 adultos. Lindeberg e Elbrond (1990) avaliaram 50% da população da Dinamarca de 1965 a 1984 e encontraram uma incidência geral de 3,84 casos a cada 100.000 habitantes. Para a população pediátrica a incidência foi de 3,63 a cada 100.000, enquanto que para a população adulta a taxa foi de 3,94 a cada 100.000. Uma avaliação mais recente, realizada no Canadá por Campisi, em 2010, reuniu em um banco de dados nacional informações sobre todas as crianças com menos de 14 anos diagnosticadas com papilomatose respiratória entre os anos de 1997 a 2007 e encontrou uma incidência de 0,24 a cada 100.000 pessoas (CAMPISI et al., 2010). Ainda não existem dados disponíveis a respeito da incidência e prevalência da papilomatose respiratória no Brasil.

A papilomatose respiratória é uma enfermidade que induz a neoplasia e se manifesta como proliferação celular da mucosa. Os principais sintomas são a rouquidão e o estridor (KASHIMA et al., 1993; DERKAY, 2001). Entretanto, vários outros sintomas podem ser notados na PRR, como tosse, chiado, distúrbio de voz, dispneia crônica, choro fraco de caráter progressivo em crianças, engasgo, síncope e a obstrução aguda das vias respiratórias. Algumas vezes estes sintomas podem ser acompanhados por tosse crônica ou pneumonia recorrente (DERKAY e WIATRAC, 2008). Além destes sintomas, a PRR pode ocasionar a transformação da mucosa afetada em carcinoma de células escamosas, sendo que a chance de transformação pode variar entre 2 e 17% (BRANDWEIN-GENSLER e VAN DE WATER,

2006). A incidência da transformação maligna varia entre os dois grupos de faixa etária. Em Papilomatose respiratória recorrente adulta, a taxa de transformação varia entre 3 e 6% dos casos (HARTLEY et al., 1994). Já para a papilomatose respiratória recorrente juvenil a transformação maligna tem se mostrado muito rara, em torno de 1% dos casos (DERKAY, 1995; GEREIN et al., 2005). Em 2003, Go et al. reportaram as características moleculares e histológicas de 7 casos de transformação maligna da papilomatose respiratória recorrente em carcinoma espinocelular. Três pacientes tratados para papilomatose laríngea desenvolveram carcinoma espinocelular da laringe e quatro desenvolveram carcinoma espinocelular no pulmão, a idade média do início da transformação foi 28 anos, sendo detectados HPV-6 e -11 em quatro casos de carcinoma. Biópsias sequenciais estavam disponíveis em 5 dos sete pacientes e foi possível concluir que a transição espontânea de papiloma para carcinoma nestes pacientes não passou pela fase de progressão presente no modelo da carcinogênese, já que estes tumores são muito difíceis de serem diagnosticados precocemente (GO et al., 2003).

O curso da PRR é variável, com alguns pacientes vivenciando uma regressão espontânea e outros sofrendo do crescimento agressivo dos papilomas exigindo múltiplos procedimentos cirúrgicos (DERKAY e WIATRAC, 2008). A PPR pode manifestar-se nas formas agressiva e não agressiva. A forma não agressiva é controlável por intervenções cirúrgicas e esses casos geralmente desaparecem após alguns anos. Já a forma agressiva é caracterizada por múltiplas recorrências no sítio primário e pelo desenvolvimento de múltiplos sítios de envolvimento, incluindo o trato respiratório inferior (DOYLE et al., 1994).

A frequência de cirurgias necessárias para manter a via aérea desobstruída é um potencial indicador da severidade da doença. A remissão da doença pode ocorrer em qualquer estágio e a sua duração é extremamente variável (EVANS, 1996). A infecção na laringe resulta em remissão mais frequente do que a infecção do pulmão, que é geralmente fatal. Acreditava-se que o início da puberdade poderia provocar a remissão da doença, mas essa hipótese foi descartada (GEREIN et al., 2006).

Por ser uma doença caracterizada por uma variedade de sintomas, o seu diagnóstico é difícil e muitas vezes confundido com outras enfermidades, como asma e bronquite (STAMATAKI et al., 2007). Os métodos mais precisos para um rápido diagnóstico da papilomatose de laringe são a laringoscopia direta, endoscopia e biópsia do tecido, podendo também ser diagnosticada pela detecção do DNA (ácido desoxirribonucleico) de HPV por meio de técnicas de biologia molecular (DRAGANOV et al., 2006).

### 1.1.1. Transmissão

A papilomatose respiratória recorrente é causada pelo HPV e o vírus pode ser transmitido de maneira horizontal ou vertical. O modo exato da transmissão permanece indefinido, variando provavelmente com a idade do paciente na apresentação da doença (KASHIMA et al., 1992). O principal reservatório dos tipos de HPV que causam a PRR é o trato genital (KOUTSKY, 1997; INSINGA et al., 2003) e o DNA do HPV está presente na mucosa normal do trato respiratório superior em 5 a 20% dos casos (AALTONEN et al., 2002).

Em pacientes com papilomatose adulta, a transmissão ocorre horizontalmente, predominantemente, pelo contato sexual. A relação sexual não é a única maneira de transmissão do HPV, podendo também ser transmitido por outras práticas sexuais, tais como: sexo oral, sexo anal e sexo dígito-vaginal (EDWARDS e CARNE, 1998; SONNEX et al., 1999; GERVAZ et al., 2003). A transmissão em pacientes adultos tem sido associada positivamente com um maior número de parceiros sexuais durante a vida e com um contato orogenital mais frequente do que aquele observado na população em geral (KASHIMA et al., 1992). O risco de infecção por HPV em pessoas que tiveram múltiplos parceiros sexuais (entre 10 e 49 parceiros) está em torno de 21%, enquanto que este percentual diminui para 7% naqueles pacientes que tiveram apenas um parceiro durante sua vida sexual (STONE et al., 2002). É considerada a possibilidade de que, em alguns casos de papilomatose adulta a infecção é uma reativação de uma infecção prévia ao vírus durante o nascimento, ao invés de uma transmissão sexual, sendo uma consequência da habilidade do vírus em permanecer latente (STEINBERG et al., 1983; RIIKANEN et al., 1993; SMITH et al., 1993).

Para crianças e lactantes com PRR acredita-se que a transmissão seja vertical, devido à inexistência de contato sexual. Entretanto ainda não está esclarecido o modo exato e a fase viral da transmissão (CASON e MANT, 2005; CASTELLSAGUE et al., 2009). Diversos estudos têm associado fortemente a papilomatose juvenil a mães com infecções genitais ativas causadas pelo HPV, e a rota mais aceitável de transmissão vertical do vírus é durante o nascimento, através da exposição direta às lesões cervicais e genitais presentes no canal do parto (KASHIMA et al., 1992; DERKAY e WIATRAC, 2008). Foi demonstrado por Silverberg et al. (2003) que crianças nascidas de mães com condiloma ativo apresentaram um risco 231 vezes maior de desenvolver PRR.

Contudo, pode haver outras formas de contágio além da transmissão no momento do parto. O DNA do HPV tem sido encontrado em tecido placentário e no sangue do cordão umbilical (GOMEZ et al., 2008; SARKOLA et al., 2008), possivelmente levando a infecção

transplacentária. O HPV também foi encontrado no líquido amniótico (SEDLACEK et al., 1989), podendo ser a razão de alguns bebês já nascerem com lesões na laringe.

Além disso, outros fatores como idade materna menor do que 20 anos e o tipo de parto são considerados importantes determinantes da transmissão (GEREIN et al., 2007). Foi sugerido que filhos de mulheres na primeira gestação e com trabalhos de parto com mais de 10 horas de duração apresentam um risco maior de desenvolver PRR, pois o feto é exposto ao vírus por períodos prolongados (KASHIMA et al., 1992).

### **1.1.2. Tratamento**

A papilomatose respiratória recorrente pode apresentar cursos diferentes dependendo da imunidade do hospedeiro e do tipo de HPV. Em alguns casos a doença pode apresentar remissão espontânea ou pode seguir um curso mais agressivo, com a necessidade de diversas cirurgias anualmente (VENKATESAN et al., 2012).

Atualmente, há uma variedade de terapias que é adotada de acordo com o perfil específico de cada paciente. As terapias têm o objetivo de aliviar os sintomas da doença, que incluem: erradicar os papilomas das vias aéreas, melhorar a qualidade da voz e controlar a disseminação da doença (GALLAGHER e DERKAY, 2008).

A cirurgia ainda é a principal opção terapêutica para a remoção dos papilomas benignos, pois preserva a via respiratória e a qualidade da voz (ZEITELS et al., 2006). Assim, os tratamentos modernos incluem a cirurgia de aço frio, microdebridador e, menos comumente, a remoção com laser. (CARROLL e SAUNDERS, 2002). As vantagens do uso de microdebridador para a remoção das lesões incluem o mínimo trauma na laringe, menor trauma térmico, tempo de procedimento menor, melhoria na qualidade da voz, custo menor em comparação com o procedimento a laser e não há aumento nos *scores* da dor (PASQUALE et al., 2003). Como em muitos casos repetidas cirurgias são necessárias, isso causa um custo emocional para os pacientes e familiares (LINDMAN et al., 2005). De acordo com o Registro Nacional de Crianças com PRR dos Estados Unidos, os pacientes são submetidos a uma média de 19,7 procedimentos ou em média 4,4 procedimentos por ano, o que equivale a mais de 10.000 procedimentos cirúrgicos por ano gerando um alto custo anual, estimado em 150 milhões de dólares (DERKAY, 1995; ARMSTRONG et al., 1999).

Além dos métodos de remoção do tumor, tratamentos adicionais para retenção viral e crescimento dos papilomas incluem terapias farmacológicas adjuvantes como o Cidofovir, índole-3-carbinol, di-indolymethane, interferon-alfa, ribavirina e terapia fotodinâmica (DONNE e CLARKE, 2010). Atualmente, aproximadamente 20% das crianças com PRR

necessitam de alguma forma de tratamento coadjuvante (SCHRAFF et al., 2004). O Interferon-alfa é utilizado em casos mais severos, e parece ser efetivo em aproximadamente um terço dos pacientes, entretanto apresenta efeitos colaterais reconhecidos (LEVENTHAL et al., 1988).

A terapia medicamentosa mais utilizada no tratamento da papilomatose de laringe é a injeção intra-lesional de Cidofovir (SCHRAFF e DERKAY, 2004). O Cidofovir é um análogo de nucleosídeo da deoxicidina monofosfato. Esta pré-droga requer fosforilação para a conversão em sua forma ativa, que então incorpora-se no DNA. A acumulação da droga ativa no DNA produz toxicidade e o cidofovir tem se mostrado ser efetivo contra uma variedade de vírus (DONNE et al., 2007).

Estudos clínicos e laboratoriais tem demonstrado efetividade no tratamento intra-lesional de PRR em adultos e crianças (PRANSKY et al., 2003; MANDELL et al., 2004), sendo amplamente utilizado em pacientes com quadro clínico severo (SCHRAFF e DERKAY, 2004). A administração intra-lesional de Cidofovir pode ajudar a controlar o crescimento recorrente dos papilomas e a reduzir a severidade da doença (SPIEGEL et al., 2005).

Apesar de diversos estudos demonstrarem a efetividade da terapia com Cidofovir no tratamento de PRR, alguns estudos com animais mostraram que o Cidofovir pode ser teratogênico, embriotóxico e carcinogênico, provocando um significativo aumento de adenocarcinomas mamários em ratos (WUTZLER e THUST, 2001). A administração intravenosa em animais e humanos mostrou severa nefrotoxicidade (GOON et al., 2008).

É importante ressaltar a relação entre a presença da doença do refluxo gastroesofágico e a papilomatose respiratória recorrente. Esta relação pode ser atribuída ao fato de que o contato crônico do ácido com os tecidos causa uma inflamação que pode resultar na expressão do HPV nesses locais (MCKENNA e BRODSKY, 2005). Alguns estudos têm demonstrado que a taxa de recorrência em crianças com papilomatose diminui após o tratamento antirrefluxo (HARCOURT et al., 1999; MCKENNA e BRODSKY, 2005).

Atualmente estão disponíveis comercialmente duas vacinas (bivalente e quadrivalente) que provaram ser eficazes na prevenção por HPV (SKJELDESTAD et al., 2008). As vacinas são produzidas a partir de partículas não infecciosas chamadas de VLPs (*Virus Like Particles* - Partícula Semelhante a Vírus) que são formadas pela proteína do capsídeo viral L1. A vacina bivalente é chamada comercialmente de Cervarix® (GlaxoSmithKline) e fornece imunidade contra os tipos HPV- 16 e HPV-18, mas não é efetiva contra os HPVs dos tipos 6 e 11. Portanto, o uso dessa vacina não contribui na redução de casos de PRR, que ocorre devido à

infecção por HPV-6 ou HPV-11. No entanto, testes conduzidos com Cervarix® mostraram 100% de eficácia em prevenir a infecção com HPV-16 e HPV-18 (HARPER et al., 2004). A vacina quadrivalente, Gardasil® (Merck), apresentou eficácia na prevenção da infecção pelos HPVs dos tipos 6, 11, 16 e 18. Estudos têm demonstrado que 99,7% dos indivíduos nos testes clínicos da vacina desenvolveram resposta imune à vacina (KOUTSKY et al., 2002; VILLA et al., 2005). É possível que a implementação de programas de imunização, com a vacina quadrivalente, para mulheres adolescentes e adultas tenha um efeito significativo na redução da papilomatose de laringe, uma vez que a vacina reduz significativamente novas infecções causadas pelo HPV (DERKAY e BUCHINSKY, 2007; PAWLITA e GISSMANN, 2009).

## 1.2. Papilomavírus Humano

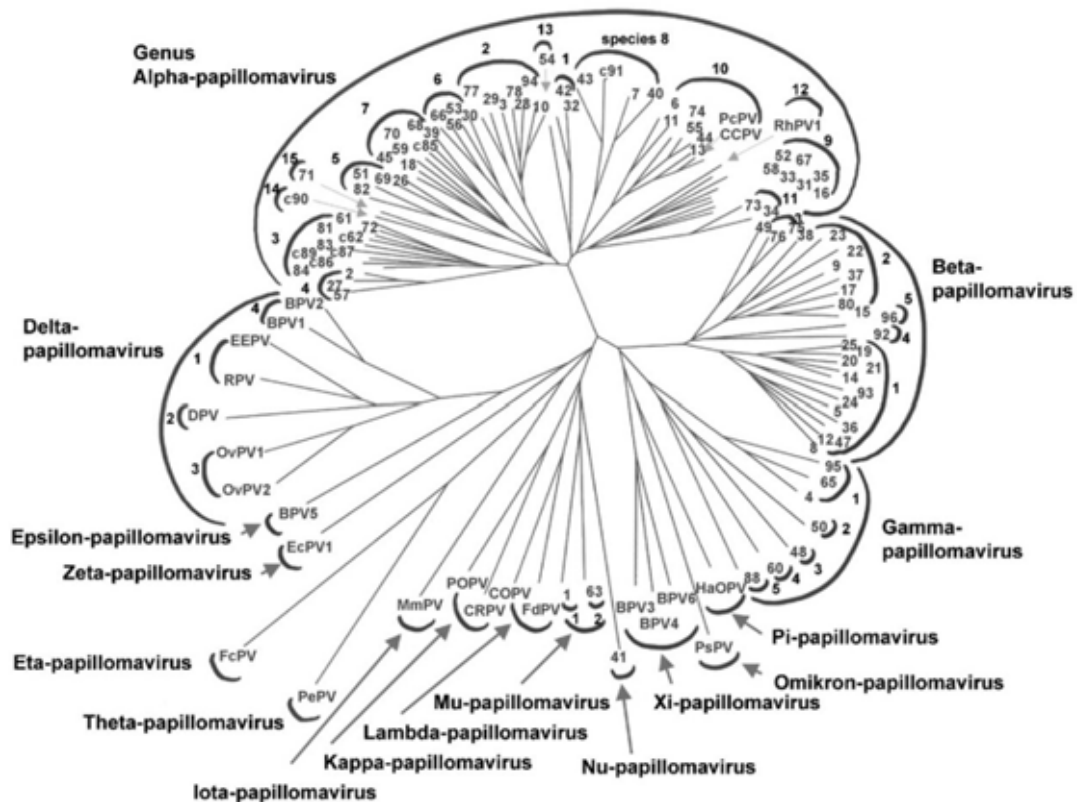
### 1.2.1. Taxonomia

Originalmente os papilomavírus foram agrupados junto com os poliomavirus na família Papoviridae. Eles foram classificados juntos devidos à similaridade do capsídeo não envelopado e por ambos possuíres como genoma uma molécula de DNA de fita dupla circular. Posteriormente foi reconhecido que os vírus possuíam tamanho e organização do genoma diferente além disso, não possuíam grande similaridade na sequência de nucleotídeos ou aminoácidos. Assim foram reconhecidos pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) como duas famílias separadas, *Papillomaviridae* e *Polyomaviridae* (DE VILLIERS et al., 2004).

O HPV pertence à família *Papillomaviridae*, que é composta por 30 gêneros (Figura 2). O gênero *Alphapapilomavirus* é o mais diverso com 14 espécies e neste gênero são encontrados os tipos que infectam preferencialmente a mucosa oral e anogenital em humanos e primatas (ICTV, 2011). Os membros da família *Papilomaviridae* são comuns na natureza e já foram isolados e caracterizados de répteis (HERBST et al., 2009), aves (TERAI et al., 2002), marsupiais (BENNETT et al., 2010), e diversas outras espécies de mamíferos (BERNARD et al., 2010).

O táxon espécie é baseado na relação filogenética próxima que alguns tipos de HPV possuem. As espécies são compostas tipicamente por tipos de papilomavírus que possuem propriedades biológicas e patológicas comuns. Os HPVs dos tipos 6 e 11, juntamente com os tipos HPV-11, HPV-13, HPV-44, HPV-74 e PcpV pertencem à Espécie 10. Os membros desta família estão associados principalmente com lesões benignas na mucosa e são considerados de baixo risco oncogênico (DE VILLIERS et al., 2004).

Existem numerosas variantes para cada tipo de HPV, contudo os subtipos são extremamente raros, por razões ainda desconhecidas. Somente quatro genomas correspondem a definição de subtipo. O HPV-55, que foi reclassificado como um subtipo do HPV-44; HPV-46 que é considerado como um subtipo do HPV-20; HPV-64 que foi classificado como subtipo do HPV-34 e os subtipos para HPV-68: HPV-68a e HPV-68b (REUTER et al., 1991; LONGUET et al., 1996).



**Figura 2:** Árvore filogenética baseada na análise da sequência do gene L1 de 118 tipos de papilomavírus. Os números nas pontas dos ramos identificam os tipos de HPV, “c” seguido de um número indica um novo candidato a tipo de HPV. Todas as outras abreviações se referem a tipos de papilomavírus que infectam animais. Os semicírculos externos identificam os gêneros e os semicírculos internos, as espécies. Fonte: Modificado de de Villiers et al., 2004.

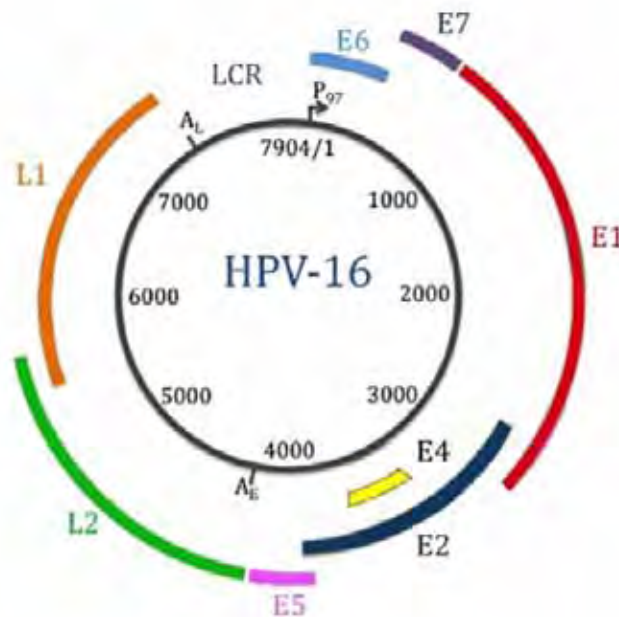
### 1.2.2. Biologia do Papilomavírus Humano

Os Papilomavírus são vírus pequenos, medindo de 52 a 55 nm de diâmetro. Apresentam um genoma composto por uma única molécula de ácido desoxirribonucleico circular de dupla fita com 7200 a 8000 pares de base, dependendo do genótipo analisado. Possui um capsídeo de simetria icosaédrica com 72 capsômeros, sem envelope lipoprotéico. Este vírus é epiteliotrópico com preferência por queratinócitos (NEBESIO et al., 2001),



infectando as células da camada basal do epitélio estratificado. A expressão dos genes virais está diretamente relacionada com a diferenciação celular do hospedeiro (MCMURRAY et al., 2001).

O genoma é dividido em regiões denominadas sequências abertas de leitura, do inglês *open reading frames* (ORF), que estão localizados na mesma fita de DNA. Estas ainda podem ser funcionalmente separadas em três regiões principais: a primeira é uma região regulatória, não codificadora, de 400 a 1.000 pares de bases que é conhecida pelas denominações *long control region* (LCR) ou *upper regulatory region* (URR), situada entre os genes L1 e E6. É nesta região pouco conservada que estão localizados as sequências reguladoras e iniciadoras da replicação viral. A segunda é chamada de região precoce ou E, constituída pelos ORFs: E1, E2, E4, E5, E6 e E7, que estão envolvidos na replicação viral, no controle da transcrição e na oncogênese. A terceira região é denominada tardia ou L codifica as proteínas L1 e L2 do capsídeo viral (BERNARD, 2002; CHOW et al., 2010) (Figura 3).



**Figura 3:** Representação esquemática do genoma do Papilomavírus Humano do tipo 16 (HPV-16), evidenciando região regulatória (LCR), as regiões precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e as regiões tardias (L1 e L2). HPV-16 possui um genoma de DNA fita dupla circular. O promotor da transcrição é denominado P97. AE e AL são os sítios de poliadenilação precoces e tardios, respectivamente. Fonte: Modificado de Lin et al., 2010.

Os genes *E1* e *E2* codificam proteínas regulatórias importantes para o HPV (proteínas E1 e E2). As funções destas duas proteínas são essenciais para o processo de replicação viral e infecção celular. A proteína E2 reprime a transcrição unindo-se a sítios de ligação específicos

na região controladora, enquanto que a proteína E1 facilita esta ligação (CHOW et al., 2010). Acredita-se que a proteína E4 esteja envolvida em estágios posteriores do ciclo do vírus, provavelmente envolvida na destruição da estrutura do citoesqueleto da célula hospedeira facilitando a permanência e maturação do vírus (CHOW et al., 2010). A proteína E5 induz a proliferação celular, inibe a apoptose, pode ativar os receptores do fator de crescimento e outras proteínas quinases (IARC, 2007). As proteínas E6 e E7 são as principais responsáveis pela transformação nos HPV de alto-risco e atuam na modulação de atividades de proteínas celulares que regulam o ciclo celular (LONGWORTH e LAIMINS, 2004). Os genes tardios L1 e L2 codificam proteínas do capsídeo viral (CHOW et al., 2010)

Todos os tipos de HPV possuem dois promotores principais. P1 está localizado *upstream* do gene E6, e o promotor P3 está localizado dentro do gene E7. Há também o promotor P4 que é universalmente conservado e localiza-se *upstream* da ORF do gene E6. O vírus depende fortemente de *splicing* alternativo do mRNA para acessar todas as ORFs e alguns mRNA bi ou poli-cistrônicos podem codificar mais do que uma proteína (TANG et al., 2006).

### 1.2.3. Diversidade genética do vírus

A classificação dos HPVs é baseada na diversidade genômica do gene L1. Entre os gêneros da família *Papillomaviridae* há uma diferença maior de 40% na sequência nucleotídica do gene L1, já para as espécies esta diferença varia entre 30% e 40%. Há ainda uma classificação dos papilomavírus em tipos, subtipos e variantes. Um tipo de HPV difere de outro quando apresenta ao menos 10% de divergência na sequência do gene L1. Em adição, isolados do mesmo tipo são classificados em subtipos quando a sequência nucleotídica diverge entre 2% a 10%, e diferenças menores do que 2% definem uma variante (BERNARD et al., 2006).

Mais de 150 tipos de HPV foram identificados (DE VILLIERS et al., 2004), podendo ser classificados de acordo com o seu potencial oncogênico em HPV de baixo risco e alto risco (IARC, 2007). Os tipos de baixo risco detectados com maior frequência são os HPV-6 e -11, estando normalmente associados a lesões benignas como papilomatose de laringe ou verrugas genitais e perianais. Os tipos de alto risco mais frequentemente detectados são os HPV-16, -18, -31, -33, -35, esses tipos estão associados com carcinoma do colo do útero, tumores na região genito-anal, câncer cervical e câncer de cabeça e pescoço (KLOZAR et al., 2010).

A comparação da sequência completa de nucleotídeos de 12 isolados de HPV-16 mostrou que 4% do genoma total foi variável dentro dos 8 genes, e 9,9% das posições de aminoácidos são variáveis (CHEN et al., 2005). Os genes E4 e E5 são descritos como mais variáveis do que a LCR, que foi previamente reportada com 5% de dissimilaridade entre as variantes moleculares (HO et al., 1993). Além disso, foi observado que as proteínas E5 e E2 apresentam a maior proporção de mutações sinônimas/não sinônimas. A partir da análise da diversidade genética de E6 e E7 em variantes de HPV-58 e HPV-52 (CHAN et al., 2002; AHO et al., 2003) notou-se que a região do gene E7 apresentava uma variabilidade genética maior em relação ao gene E6. Em contraste, para o HPV-16 o gene E6 apresentou variabilidade maior do que o E7 (ZEHBE et al., 1998; NINDL et al., 1999).

Acredita-se que mutações na LCR e nos genes E6 e E7 podem afetar o resultado clínico da infecção, indicando que a variabilidade nucleotídica é importante para o potencial oncogênico de diferentes tipos de HPV (SICHERO e VILLA, 2006). A análise extensiva do gene E6 de diferentes variantes moleculares de HPV-16 revelou a presença de mutações de aminoácidos que se sobrepõe em posições cruciais para a interação com p53 (YAMADA et al., 1997).

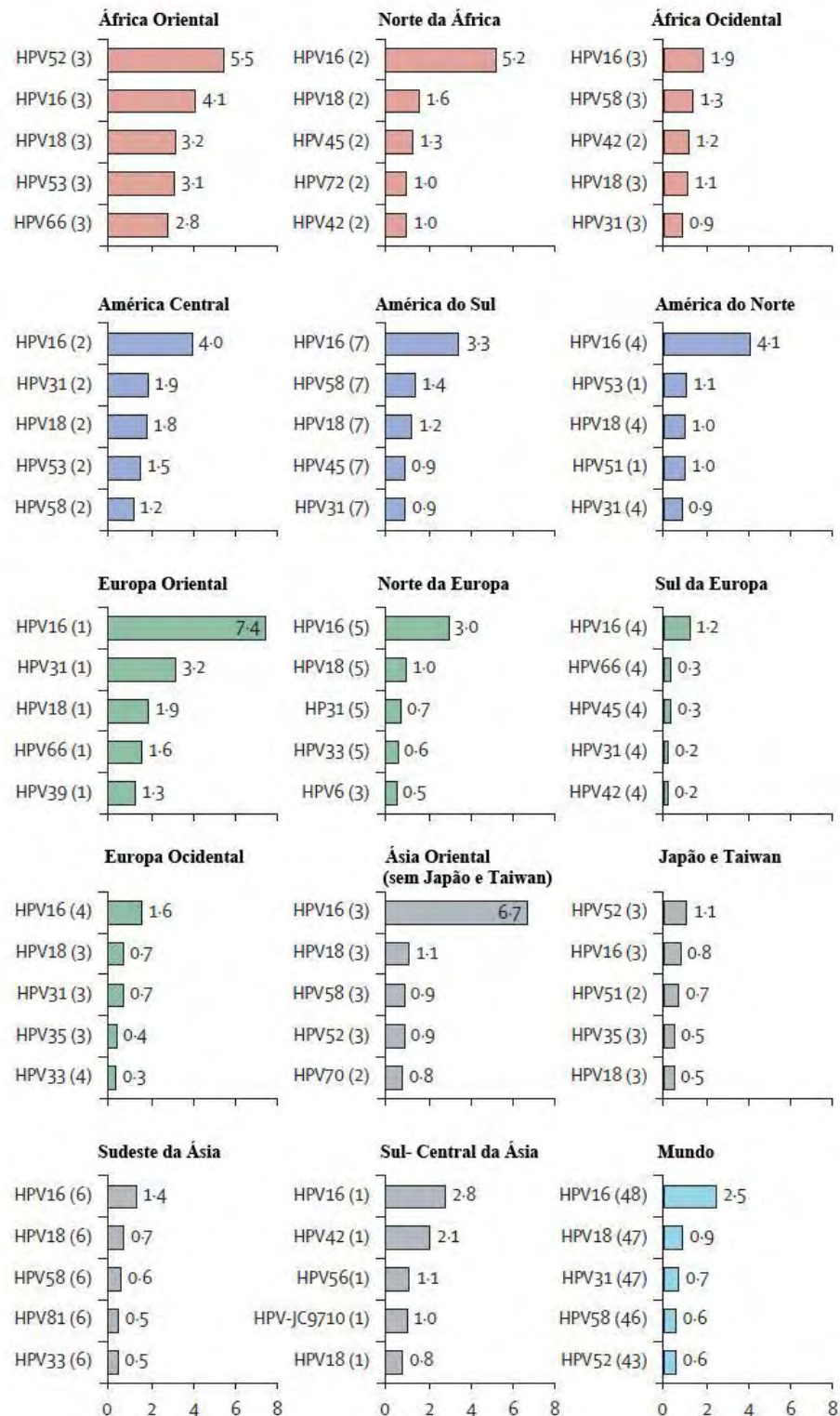
Crook et al estudaram uma matriz de substituições simples de aminoácidos e mutantes de E6 de HPV-16 que apresentaram diversas deleções assim como E6 quiméricas para avaliar a ligação à p53 *in vitro*, a degradação de p53 e a transativação transcripcional. Mutantes de E6 com deleções que resultaram em trunicações nos resíduos 59 e 110 indicaram o envolvimento dos resíduos de aminoácidos presentes da extremidade C-terminal até o resíduo 59, e análises adicionais localizaram o sítio de interação entre os resíduos 106 e 115, e as alterações entre as posições 123 e 132 resultaram em efeitos mais fracos. Análises mais detalhadas pertiriram a Crook et al. inferirem que o principal sítio de ligação com p53 está localizado aproximadamente entre os aminoácidos 106 e 110 da E6 de HPV-16 (CROOK et al., 1991)

Os isolados de HPV-6 podem ter similaridade com a variante genômica protótipo HPV-6b ou com as variantes não-protótipas HPV-6a e HPV-6vc (HEINZEL et al., 1995). A sequência de referência HPV-6b foi originalmente detectada na Alemanha de um espécime de condiloma acuminata (GISSMANN e ZUR HAUSEN, 1980; DE VILLIERS et al., 1981; KOVELMAN et al., 1999). A variante HPV-6a foi detectada nos Estados Unidos em uma amostra de condiloma acuminata vulvar (HOFMANN et al., 1995) no mesmo país, a variante HPV-6vc foi detectada em um espécime de carcinoma verrucoso vulvar (RANDO et al., 1986). A sequência protótipo do HPV-11 foi detectada em um espécime de papiloma de

laringe em 1982 por *Southern Blot*, e a sequência completa de nucleotídeos deste clone foi caracterizada completamente em 1986 (GISSMANN et al., 1982; DARTMANN et al., 1986).

A distribuição mundial dos diferentes tipos de HPV apresenta-se de forma diversificada, contudo essa observação ainda tem determinantes desconhecidos. Uma meta-análise (DE SANJOSE et al., 2007) sobre a distribuição dos tipos do HPV em mulheres com citologia normal mostrou que o HPV-16 foi o tipo mais prevalente em todas as regiões, exceto na região Oriental da África, no Japão e em Taiwan, onde o tipo mais prevalente foi o HPV-52. Considerando todas as regiões, o segundo tipo mais prevalente foi o HPV-18, assim como nas regiões individuais da Ásia oriental (excluindo-se o Japão), no norte da África, no norte e no oeste da Europa. O HPV-58 foi o segundo mais prevalente na África ocidental e na América do Sul. Na América central e na Europa oriental o HPV-31 foi o segundo mais prevalente, assim como o HPV-53 na América do Norte (Figura 4).

Os dados sobre as prevalências dos diferentes tipos de HPV no Brasil ainda são bastante limitados, entretanto, a distribuição desses tipos não parece ser homogênea por todo país. Seguindo o padrão mundial o HPV-16 mostrou-se mais prevalente no Rio de Janeiro (35,5%), Recife (55,1%) e Distrito Federal (49,2%) (LORENZATO et al., 2000; CAMARA et al., 2003; PEREIRA et al., 2007). Em Belém-PA 21,2% das amostras de neoplasia intraepitelial cervical II e III (NIC II e III) apresentaram HPV-31, -33 e -58 (NORONHA et al., 1999).



**Figura 4:** Ranking dos cinco tipos de HPV mais comuns entre mulheres com citologia normal dentro das regiões do mundo. Os dados são baseados na meta-análise de 48 estudos. Cada estimativa foi ponderada incluindo o número de mulheres testadas para cada tipo de HPV. Em parênteses estão indicados o número de estudos avaliados. Os valores estão indicados em porcentagem. Fonte: Modificado de de Sanjosé et al., 2007

#### 1.2.4. O Ciclo de infecção viral

A replicação do HPV ocorre no epitélio estratificado, onde as partículas virais entram no tecido epitelial através de microlesões e infectam as células do epitélio basal com um baixo número de cópias (MCMURRAY et al., 2001). Imediatamente após a infecção da camada basal o capsídeo proteico é decomposto e o genoma viral segue em direção ao núcleo, onde é mantido na forma epissomal e independente do genoma do hospedeiro. Pouco tempo após a infecção ocorre um ciclo de replicação do DNA viral, independente do ciclo celular, que amplifica o genoma viral para aproximadamente 50-100 cópias por célula e não está associado com anormalidade citológica (SCHILLER et al., 2010).

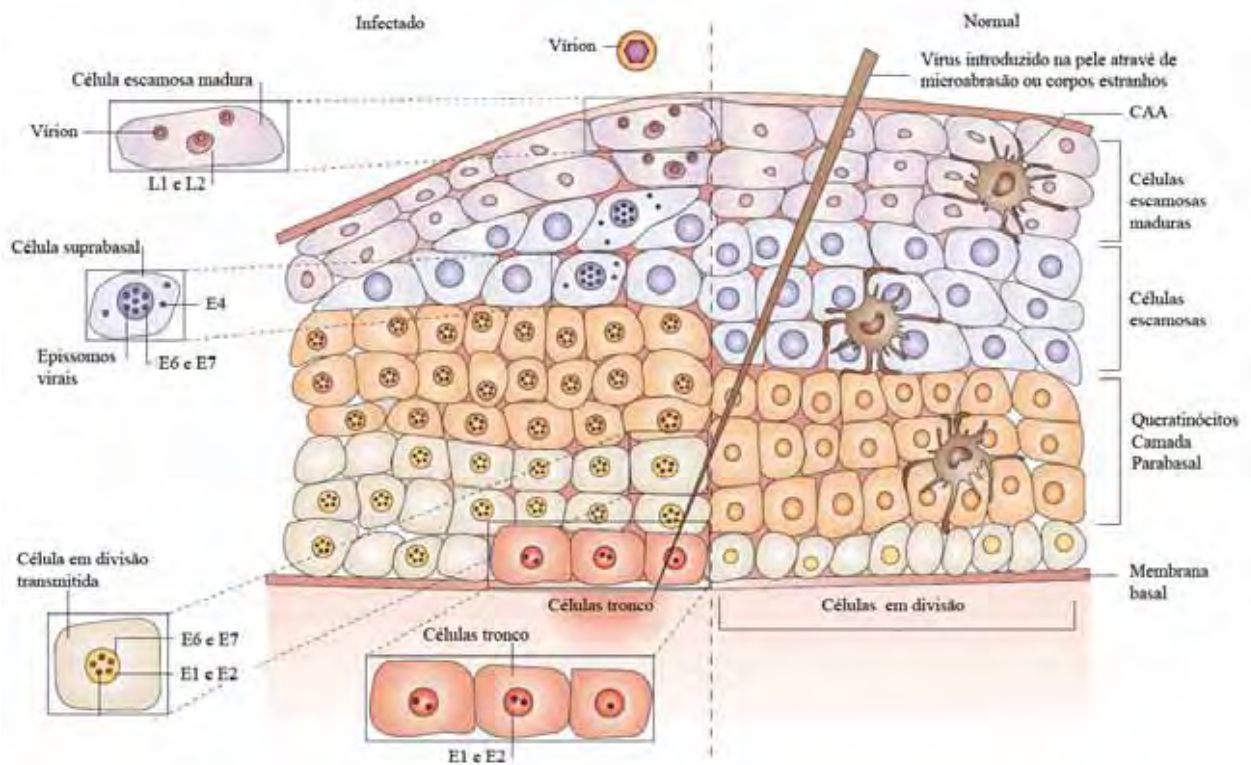
Após a divisão celular, uma célula-filha permanece na camada basal do epitélio, enquanto que a outra célula-filha migra para o próximo nível do epitélio estratificado e inicia a diferenciação. O ciclo de replicação viral ocorre à medida que as células infectadas movem-se através do epitélio, onde o DNA viral é amplificado na camada espinhosa; a transcrição e tradução dos genes tardios ocorrem na parte superior do epitélio e a montagem das partículas virais ocorre na camada cornificada. As partículas virais maduras são liberadas na superfície do epitélio durante a descamação celular (MCMURRAY et al., 2001). O ciclo infeccioso *in vivo* leva, em média, de 2 a 3 semanas. Este é o tempo necessário para o queratinócito mover-se da camada basal em direção à superfície do epitélio e diferenciar-se (STANLEY, 2010) (Figura 5).

A proteína viral codificada pelo gene E1 é a única enzima de replicação do DNA codificada pelos papilomavírus. Excluindo-se as proteínas virais E1 e E2, a replicação viral é totalmente dependente da maquinaria celular de síntese de DNA. Entretanto, os fatores de replicação e as DNA-polimerases celulares só estão presentes em células em divisão e a replicação viral não ocorre em tais células. Para resolver esse problema, o HPV codifica proteínas que reativam a síntese de DNA celular, inibem a apoptose e atrasam a diferenciação dos queratinócitos infectados, criando um ambiente permissivo para a replicação do DNA viral (ZUR HAUSEN, 2002).

Em alguns casos, principalmente quando a infecção ocorre por HPVs de alto risco, pode ocorrer persistência viral, integração do genoma viral no genoma do hospedeiro e transformação das células infectadas. Em lesões cervicais de alto grau e nos tumores, o DNA do HPV está geralmente integrado ao genoma do hospedeiro. Este evento promove a perda do gene E1 e o rompimento do gene E2. A integração ocasiona o término da amplificação viral e a ativação constante do promotor precoce do HPV resultando em uma super expressão de E6

e E7 e levando a imortalização e transformação das células (ROMANCZUK e HOWLEY, 1992; FRANCO e HARPER, 2005).

Estudos reportam que o evento de integração é aleatório e pode envolver quase todos os cromossomos, assim vários sítios de integração estão sendo mapeados (YU et al., 2005). Um estudo recente (DAS et al., 2012) avaliou o sítio de integração de dois tipos de HPV (HPV-16 e HPV-18) em amostras de câncer cervical. O sítio de integração pôde ser predito com alto *score* em 48 dos 68 casos avaliados. Observou-se que os sítios de integração do genoma do HPV estavam distribuídos através do genoma do hospedeiro. Entretanto, a integração foi mais frequente nos seguintes locus: 1p (n=7), 3q (n=8), 13q (n=4), 6q (n=4), 11q (n=4) e 20q (n=4).



**Figura 5: Arquitetura celular do epitélio escamoso estratificado e a expressão das proteínas do HPV após a infecção.**

As células-filhas das células tronco epiteliais dividem-se ao longo da membrana basal e tornam-se maduras conforme migram verticalmente sem divisões adicionais (lado direito da figura). Após a introdução do HPV nas células tronco da camada basal do epitélio, ocorre a expressão das proteínas virais não estruturais. Sob a regulação dessas proteínas, a população de células em divisão expande verticalmente e a diferenciação das células epiteliais é atrasada e incompleta. Como mostrado, as proteínas virais são expressas sequencialmente à diferenciação, e as partículas virais maduras são produzidas somente nas camadas mais superficiais do epitélio. CAA: células apresentadoras de antígeno. Fonte: Modificado de Frazer, 2004.

### 1.2.5. A proteína E6

A proteína E6 possui em torno de 150 aminoácidos, com o seu tamanho variando de acordo com o tipo de HPV. Apesar de pequena, a E6 induz a várias mudanças importantes na célula hospedeira que influenciam no ciclo de vida normal da célula e no processo de imortalização. Além disso, a E6 também está envolvida no reconhecimento imunológico do hospedeiro para estabelecer a persistência viral (KIYONO et al., 1998; LIU et al., 1999).

Em HPV de alto risco a proteína oncogênica E6 ativa a degradação do gene supressor de tumor *p53*. A proteína E6 recruta a ubiquitina ligase celular E6AP e juntas formam um complexo trimérico com a *p53*, levando a ubiquitinação e a degradação proteossomal de *p53* (HUIBREGTSE et al., 1991; SCHEFFNER et al., 1993). A proteína *p53* é responsável por monitorar e proteger a integridade do genoma induzindo genes que regulam o ciclo celular e o reparo do DNA, ou alternativamente a senescência ou apoptose da célula. Dessa maneira a inativação, degradação ou mutação em *p53* pode desregular suas funções resultando no aumento da proliferação celular e sobrevivência celular prolongada (NGHIEM e KUPPER, 1998; PIM e BANKS, 2010). A proteína E6 de HPVs de baixo risco pode interagir de maneira diferente com *p53*. Ao contrário da E6 em HPV de alto risco que está localizada primariamente no núcleo, a E6 de HPV-11 localiza-se no citoplasma e a super expressão de E6 resulta na translocação de *p53* para o citoplasma. Observou-se que a expressão de E6 do HPV-11 leva a apoptose celular dependente de *p53* (SUN et al., 2008).

Além dessas propriedades, oncoproteína E6 também pode mediar a proliferação celular através do domínio PDZ-ligante (DOORBAR, 2005). Proteínas que possuem o domínio PDZ estão localizado em áreas de contato célula-célula, como junções de células epiteliais, e está associado às vias de transdução de sinal. A ligação da oncoproteína E6 de HPVs de alto risco às proteínas da família PDZ pode levar a degradação do domínio PDZ (LONGWORTH e LAIMINS, 2004; ELGUI DE OLIVEIRA, 2007), levando a uma desregulação da organização, diferenciação e integridade cromossômica das células epiteliais infectadas pelo HPV (VON KNEBEL DOEBERITZ, 2002). Isso pode contribuir para a transformação morfológica dos queratinócitos infectados com o HPV de alto risco e à indução de hiperplasia epitelial (NGUYEN et al., 2003; WATSON et al., 2003).

A interação com o domínio PDZ é observada somente em E6 de alto risco, sendo assim, os HPVs de baixo risco foram originalmente considerados como incapazes de recrutar ubiquitina ligases para degradar alvos celulares. Contudo, um estudo realizado em 2002 por Pin, et al. demonstrou através da inserção dos últimos seis aminoácidos da E6 de um HPV de



alto-risco na extremidade carboxi-terminal da E6 de HPV de baixo risco, a capacidade da E6 recombinante em dirigir a degradação de alvos celulares. Foi possível concluir que E6 em HPVs de baixo risco são capazes de se conjugar a sistemas proteolíticos celulares e que a via de degradação dos alvos celulares ocorre por diferentes vias de ubiquitina ligase (PIM et al., 2002)

A oncoproteína E6 de HPVs de alto risco também apresenta a capacidade de ativar a enzima telomerase, prevenindo o encurtamento dos telômeros resultando em prolongação da vida útil das células infectadas com HPV (ELGUI DE OLIVEIRA, 2007). Em adição, a E6 liga-se a diversas proteínas celulares divididas em quatro classes: co-ativadores transcricionais, proteínas envolvidas na polaridade celular e motilidade, supressores de tumor e indutores de apoptose e fatores de reparos do DNA (IARC, 2007).

Como visto, as proteínas E6 de HPVs de alto e baixo risco, não compartilham as mesmas propriedades. Contudo, tanto E6 de alto risco, quanto de baixo risco podem reprimir os fatores de transcrição regulados por p53 através da inibição da acetilação de p53 por p300 (PATEL et al., 1999). Adicionalmente, tem sido reportado que E6 de HPVs de baixo risco podem se ligar a p73 (PARK et al., 2001). A relevância fisiológica dessas interações realizadas pela E6 de HPV de baixo risco não está completamente esclarecida (OH et al., 2004).

## **2. Justificativa**

A Papilomatose respiratória recorrente é uma doença benigna que afeta o trato respiratório superior e está associada com infecções pelo HPV, principalmente dos tipos 6 e 11 (MOUNTS e KASHIMA, 1984). A doença é caracterizada pela presença de tumores múltiplos ou solitários no trato respiratório. Apesar da natureza benigna da PRR as lesões tendem a crescer e se estender através de todo o trato respiratório, causando obstrução severa das vias aéreas e resultando em taxas consideráveis de mortalidade e morbidade, que podem aumentar em casos em que ocorre transformação maligna das lesões (GALLAGHER e DERKAY, 2008).

Até o momento, mais de 150 tipos de HPV já foram identificados, contudo poucos estudos foram realizados envolvendo as variantes de tipos de HPV menos prevalentes que os tipos de 16 e 18. Devido ao fato da papilomatose de laringe acometer o trato respiratório e levar a obstrução das vias aéreas em alguns casos, uma grande importância e atenção devem ser dispensadas aos tipos de HPV associados à papilomatose, a fim de entender melhor sua patogenicidade e infectividade.

Acredita-se que variantes do mesmo tipo de HPV podem diferir em suas propriedades patogênicas e biológicas (BERNARD, 2005; XI et al., 2007). Pois diferenças na sequência de nucleotídeos podem alterar os aminoácidos codificados, assim as variantes podem apresentar potenciais oncogênicos distintos. Diferenças na atividade de transformação das variantes dos HPVs dos tipos 16 e 18 têm sido atribuídas a LCR e aos genes E6 e E7 (VILLA e SCHLEGEL, 1991). Com isso, supõe-se que mutações nessas regiões podem ter impacto no desenvolvimento clínico da infecção.

Devido às funções conhecidas do gene E6 em HPV de alto risco acredita-se que as principais implicações funcionais da variabilidade genética do gene E6 seriam a maior ativação da telomerase, mudança na ligação e degradação de proteínas celulares, mudança na ativação de vias celulares, geração e manutenção do fenótipo transformado. A função do gene E6 em HPV de baixo risco não está totalmente esclarecida, assim como possíveis consequências da variabilidade genética, mas acredita-se que pode estar relacionado com o curso clínico da PRR.

Análises de variabilidade genética tem se tornado essencial para uma melhor compreensão da história natural e evolutiva dos papilomavírus. A diversidade genética do HPV tem sido investigada extensivamente entre os tipos de alto risco. Por meio dos resultados de diversos estudos de variabilidade genética de isolados HPV-16 e -18 originários dos 5 continentes foi possível concluir que houve uma co-evolução destes vírus com os três maiores ramos filogenéticos humanos: caucasianos, africanos e asiáticos (HO et al., 1993; ONG et al., 1993).

Em contraste, poucos estudos desta natureza têm sido realizados envolvendo variantes moleculares de tipos de HPV de baixo risco oncogênico. Deste modo, o presente trabalho se justificou pela necessidade de identificar as variantes genéticas do gene E6 em HPVs de baixo risco e as possíveis alterações em suas propriedades biológicas. Torna-se importante também estabelecer as relações filogenéticas de variantes brasileiras com variantes de outras regiões do mundo para auxiliar na compreensão da história natural dos HPVs envolvidos na patogênese da papilomatose respiratória recorrente.

### **3. Objetivos**

O presente estudo teve como objetivo estudar a variabilidade genética do gene E6 entre isolados de HPV-6 e HPV-11 detectados em amostras de papilomatose respiratória recorrente obtidas em pacientes do Brasil e determinar as relações filogenéticas das variantes detectadas no Brasil com variantes de outras regiões geográficas.

#### **Objetivos Específicos:**

- Avaliar a variabilidade genética do gene E6 de isolados de HPV-6, -11 encontrados em papilomatose respiratória recorrente de pacientes brasileiros e comparar com a literatura;
- Avaliar a relação filogenética das variantes brasileiras com variantes detectadas em outras partes do mundo e obtidas em diferentes sítios anatômicos da infecção (papilomatose de laringe, verrugas genitais, câncer cervical e esfregaço anal);
- Estabelecer possíveis correlações de variantes específicas com o quadro clínico da doença;

## 4. Material e Métodos

### 4.1. População e amostra

O estudo foi realizado com 25 amostras provenientes de biópsias obtidas por secção cirúrgica de pólipos da laringe de pacientes diagnosticados com Papilomatose Respiratória Recorrente, atendidos no Ambulatório de Laringologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Departamento de Otorrinolaringologia; USP- Ribeirão Preto. A idade dos pacientes variou de 3 a 52 anos. A severidade da doença foi determinada em cada procedimento cirúrgico utilizando o sistema de Derkay de estadiamento. (DERKAY et al., 1998).

### 4.2. Aspectos Éticos

Para que todos os direitos e liberdades dos indivíduos que participaram deste estudo sejam respeitados, o projeto foi submetido ao comitê de ética em pesquisa do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas/ IBILCE-UNESP sendo aprovado com parecer n° 018/10, demonstrando respeito às regras éticas.

Os indivíduos que por livre escolha e em pleno conhecimento de causa participaram deste projeto, representaram a decisão consciente de participação do estudo por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A escolha de participação dos indivíduos e o anonimato das informações foram respeitados.

### 4.3. Extração de DNA

As amostras de papilomatose de laringe foram submetidas à extração de DNA por meio do kit comercial QIAamp DNS Micro (QIAGEN).

Foram adicionados à amostra 180 µl do tampão ATL e 20 µl de proteinase K e misturado vigorosamente por 15 segundos. As amostras foram incubadas a 56<sup>0</sup>C *overnight*. Após o período de incubação adicionou-se 200 µl de tampão AVL e misturou-se por aproximadamente 15 segundos e em seguida adicionou-se 200 µl de etanol (96-100%). Todo o conteúdo foi transferido para a Coluna (*QIamp MinElute Column*) e submetido à centrifugação por 1 minuto a 6000 g. Transferiu-se a coluna para um tubo de microcentrífuga de 2 ml.

Adicionou-se 500 µl do tampão AW1 e foi realizada centrifugação por 1 minuto a 6000 g, em seguida a coluna foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 2 ml. A próxima etapa consistiu na adição de 500 µl do tampão AW2 seguida de centrifugação por 1 minuto a 6000 g. Foi realizada uma centrifugação adicional por 3 minutos a 20.000 g para a

secagem completa da membrana. A coluna foi transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Foram adicionados 50 µl do tampão AE no centro da membrana e incubou-se por 1 minuto e realizou centrifugação na velocidade máxima (20.000 g) por 1 minuto.

#### 4.4. Amplificação do gene endógeno GSTP1

A fim de confirmar presença do DNA extraído, 100 ng de DNA foi utilizado para amplificação por PCR (Reação de polimerase em cadeia) para o gene endógeno *GSTP1*. A reação foi realizada utilizando-se 2,5 U de polimerase (*Taq DNA Polymerase, Fermentas*), adicionado de 3,25 µl de tampão 10x, 0,06 mM de solução de MgCl<sub>2</sub>, DMSO (Dimetilsulfóxido) a 0,75% de concentração final, 0,14 mM de dNTPs, 12,5 pmol dos iniciadores específicos GSTP1(5' ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA 3') e GSTP2 (5' TGA GGG CAC AAG AAG CCC CT 3') e água livre de nuclease para o volume final de 15,0 µl. A reação foi submetida a seguinte ciclagem: um ciclo de 5 minutos a 94°C; 40 ciclos de 1 minutos a 94°C, 3 minutos a 62°C, 1,5 minutos a 72°C e 1 ciclo de 7 minutos a 72°C. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

#### 4.5. Detecção do HPV e Genotipagem

A presença do DNA de HPV nas amostras foi testada por meio de uma PCR usando os oligonucleotídeos iniciadores PGMY09/11 (BAUER et al., 1992; GRAVITT et al., 2000) que amplificam uma região de 450 pares de bases do gene L1 e detecta todos os tipos de HPV.

As reações de PCR foram realizadas utilizando 2,5 U de polimerase com atividade corretiva (*High Fidelity Enzyme Mix, Fermentas*) adicionado de 2,5 µl de tampão, 4,0 mM de solução de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de dNTPs; 0,32 mM de cada iniciador específico, 80 ng de DNA e água livre de nuclease para o volume final de 25,0 µl.

A ciclagem usada foi de desnaturação inicial de 13 minutos a 95°C, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, pareamento dos iniciadores específicos a 55°C por 1 minuto, extensão do fragmento de DNA a 72°C por 1 minuto, e uma extensão final de 5 minutos a 72°C, e 4°C ao final.

A detecção do produto amplificado foi feita por meio de uma mistura de 5 µl de produto amplificado e 2 µl de tampão de amostra aplicada em gel de agarose 1% (Gibco BRL) em tampão Tris-Borato-EDTA 1x (90 mM de Tris-Borato e 2 mM de EDTA - pH 8,0) com adição de Brometo de etídeo em uma concentração final de 0,5 µg/ml, por aproximadamente 45 minutos em 100 Volts. Um marcador de peso molecular de 100 pb era

aplicado no gel junto às demais amostras e controle negativo, para a verificação do tamanho do fragmento amplificado.

As amostras positivas para o HPV foram genotipadas por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - Polimorfismo do tamanho de fragmentos de Restrição). Para a genotipagem a região L1 do HPV foi amplificada utilizando-se do mesmo protocolo para a detecção de HPV, mas com volume final de 100,0 µl. O produto de PCR foi digerido com sete enzimas de restrição da empresa New England BioLabs (*Bam*HI, *Dde*I, *Hae*III, *Hin*fI, *Pst*I, *Rsa*I e *Sau*3AI).

Foi utilizado 10 U das enzimas *Bam*HI e *Pst*I; 5 U das enzimas *Dde*I, *Hae*I, *Hin*fI e *Rsa*I e 2 U da enzima *Sau*3AI. A cada enzima foi adicionado 1,0 µl de seu tampão específico 10x (Tabela 1) e 8,5 do produto de PCR. A reação foi submetida à seguinte ciclagem: 37°C por 2 horas, 65°C por 10 minutos e 4°C ao final.

**Tabela 1:** Relação das enzimas de digestão e a composição química de cada tampão específico

Enzima de restrição	Tampão	Composição (1x)
<i>Sau</i> 3AI	Tampão 1	10 mM Bis Tris Propano-HCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM DTT
<i>Bam</i> HI, <i>Dde</i> I e <i>Pst</i> I	Tampão 3	100 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM DTT
<i>Hae</i> III, <i>Hin</i> fI e <i>Rsa</i> I	Tampão 4	50 mM acetato de potássio; 20 mM Tris-acetato, 10 mM acetato de magnésio; 1 mM dithiotheestol

O produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de policrilamida 8% a 100 Volts por 50 minutos. Após a corrida eletroforética o gel foi corado com prata.

O perfil de digestão foi analisado por comparação com perfil de restrição realizado previamente (BERNARD et al., 1994).

#### 4.6. Amplificação da E6 e detecção dos produtos Amplificados

Foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores específicos para a amplificação do gene E6 de HPV-6 e -11. A sequência dos iniciadores específicos utilizados está representada na Tabela 2.

**Tabela 2:** Sequência dos iniciadores específicos utilizados nas reações de amplificação do gene E6 do HPV

<i>Primer</i>	<i>Sequência (5'→3')</i>
HPV6-E6F	GGGGGATCCGAATTCATGGAAAGTGCAAATGC
HPV6-E6R	GTGAAGCTTGGATCCTAGGGTAACATGTCTTCC
HPV11-E6F	AAAATTAGCAGACGAGGCATT
HPV11-E6R	CCACCTTGTCCACCTCATCT

As reações de PCR foram realizadas utilizando 6,0 U de polimerase com atividade corretiva (*High Fidelity Enzyme Mix, Fermentas*) adicionadas de 5,0 µl de tampão, 1,5 mM de solução de MgCl<sub>2</sub>; 0,24 mM de dNTPs (2 mM); 0,4 mM de cada iniciador específico (20 mM), 500 ng de DNA, e água livre de nucleases para o volume final de 50,0 µl.

A ciclagem usada foi: desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, pareamento dos iniciadores específicos a 55°C para amostras HPV-6 por 1 minuto e 50 °C para amostras HPV-11, extensão do fragmento de DNA a 72°C por 1 minuto, e uma extensão final de 8 minutos a 72°C, e 4°C ao final.

Todas as reações foram feitas em fluxo laminar utilizado apenas para preparação de reações de PCR. Todas as reações de PCR incluíram controles negativos consistindo da mistura de reação, porém sem DNA. Uma alíquota adicional para cada reação de PCR foi feita, no qual o DNA não era adicionado, servindo como controle para possíveis contaminações.

#### **4.7. Purificação dos Fragmentos Amplificados**

Os fragmentos de DNA obtidos da amplificação da E6 foram purificados e clonados por meio de reagentes e protocolos fornecidos pelo TOPO XL PCR *cloning* Kit (Invitrogen). A purificação dos produtos de PCR visou aumentar a eficiência da clonagem, utilizando-se reagentes que purificaram e minimizaram o dano no DNA. Os 45 µl de reação obtido na PCR foram misturados a 8 µl de 6X *Crystal Violet Loading Buffer* (30% Glicerol, 20 mM EDTA, 100 µg/ml Cristal Violeta) e aplicados em gel de agarose 0,8% em TAE 1X (50 mM Tris-acetato, pH 8,0, 1 mM EDTA), adicionado de 30 µl de Cristal Violeta 2 mg/ml. A eletroforese foi realizada a 80 Volts pelo período que o Cristal Violeta migrou um quarto do gel, onde o

produto de PCR pode ser visto por toda a corrida eletroforética como uma banda azul migrando pelo gel.

O fragmento de DNA foi cortado do gel em um painel de luz branca por meio de lâmina de gilete e o volume do pedaço de agarose foi estimado (considerando 1 mg/ul) e adicionado de 2,5 vezes deste volume de solução de Iodeto de Sódio (6,6 M de iodeto de sódio, 16 mM de Sulfito de Sódio), misturado vigorosamente e incubado a 50°C até a dissolução completa da agarose. Esta solução foi acrescida de 1,5 vezes o volume de tampão de ligação (7M Guanidina HCl) e foi passada em coluna de purificação, lavada com 1X Final de tampão de lavagem (400 mM NaCl, Etanol 100%) e eluída em 40 µl de Tampão TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH8). A confirmação da presença do DNA purificado foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose com brometo de etídeo, como descrita previamente.

#### **4.8. Clonagem**

A ligação do fragmento de interesse ao plasmídeo bacteriano foi realizada pela adição do produto de PCR purificado a 10 ng de pCR-XL-TOPO-vector na proporção de 3:1 (inserto: vetor) seguida da incubação a temperatura ambiente por 5 minutos. 2 µl da reação de ligação foram incubados por 30 minutos em uma alíquota de *E. coli*. competentes e posteriormente foram submetidas a choque térmico por 30 segundos a 42°C e a 2 minutos no gelo, seguida da adição de 250 µl de meio SOC (2% Triptona, 0,5% extrato de Levedo, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glucose) à alíquota e de incubação a 37°C por 1 hora. O produto da transformação foi plaqueado em meio LB (Luria-Bertani broth) sólido (1% Triptona, 1% NaCl, 0,5% extrato de Levedo, 1,5% Agar) com 50 µg/ml de Kanamicina, a 37°C por 16 horas.

As colônias resultantes da transformação foram repicadas para 250 µl de meio LB líquido (1% Triptona, 1% NaCl, 0,5% extrato de Levedo) com 50 µg/ml de Kanamicina em placa de 96 *wells* e mantidas a 37°C por 16 horas. Oitenta microlitros dos 150 µl de meio LB líquido contendo a colônia, de sete colônias correspondentes a cada amostra foram inoculadas em 3 ml de meio LB líquido com 50 µg/ml de Kanamicina em tubos de 15 ml a 37°C por 20 horas com agitação de 46 rpm.

Os plasmídeos contendo os fragmentos de interesse foram extraídos das culturas de bactérias por meio do Gene Jet™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas), de acordo com as instruções do fabricante, eluídos em 50 µl de TE Buffer e estocados a -20°C. As placas de 96 *wells* contendo as colônias obtidas de cada paciente foram estocadas em freezer -80°C.



#### 4.9. Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado segundo a técnica de Sanger de didesoxirribonucleotídeos, utilizando o Kit Big Dye terminator v.3.1 e o sequenciador automático modelo 3130XL Applied Biosystems. Na reação de sequenciamento foram utilizados os iniciadores específicos desenhados para região genômica E6 (Tabela 1).

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se 5 µl dos produtos dos minipreps, 2,0 µl de tampão de sequenciamento 5x, 2,0 µl de Big Dye, 2 mM de cada iniciador específico (20 mM) a um volume final de 10 µl. Foram sequenciados cinco clones para cada amostra.

O DNA plasmidial foi submetido ao processo de *Hot Start*, no qual as amostras foram submetidas à temperatura de 95° C por 10 minutos para uma inicial desnaturação do DNA e aumento da eficiência no anelamento dos iniciadores. Após o *Hot Start*, o mix foi adicionado às amostras e as reações foram levadas ao termociclador e submetidas à desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto, a 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 segundos, pareamento dos iniciadores específicos a 55°C (amostras HPV-6) ou 50°C (amostras HPV-11) por 15 segundos, 60°C por 4 minutos e 10°C ao final.

As reações de sequenciamento acrescidas de 2 µl de acetato de sódio 3,0 M e 2 µl de EDTA 125 mM foram submetidas à precipitação em duas etapas de centrifugação a 4°C e 4.000 rpm, sendo a primeira por 30 minutos e utilizando-se 50 µl etanol 100% em cada amostra, e a segunda por 15 minutos com 70 µl etanol 70%. Foram realizadas centrifugações a 1.000 rpm por 1 minuto com a placa ou tubos invertidos após cada etapa de centrifugação com etanol.

Após a precipitação, as amostras foram adicionadas de 10 µl de formamida, centrifugadas a 1.000 rpm por 1 minuto, submetidas a desnaturação a 95°C por 5 minutos e incubadas em gelo por 2 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas ao sequenciamento no sequenciador automático modelo 3130XL Applied Biosystems.

#### 4.10. Análises das Sequências

Para verificar a qualidade das sequências obtidas foi utilizada a ferramenta de bioinformática *Eletropherogram Quality Analysis* disponível online em <http://www.biomol.unb.br/phph>. Os cromatogramas resultantes do sequenciamento das amostras foram analisados quanto à similaridade com o HPV e com a região E6 por meio da ferramenta de bioinformática BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) do NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

O alinhamento das sequências referência e das amostras foi realizado pelo software CLUSTAL W que está hospedado no pacote do *Bioedit 7.0.9.0* (THOMPSON et al., 1997;

HALL, 1999). Em seguida as sequências foram editadas no programa *Bioedit* (HALL, 1999) a fim de remover os fragmentos do vetor resultando na sequência completa da região E6 do vírus.

Para determinar a presença de variantes genômicas as sequências foram analisadas quanto às divergências nucleotídicas em comparação com as sequências referências HPV-6b (Número de acesso X00203), HPV-6a (Número de acesso L41216), HPV-6vc (Número de acesso AF092932), HPV-11 (Número de acesso M14119) disponíveis no *GenBank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

#### **4.11. Análise *in silico* da estrutura secundária**

O servidor *Predict Protein* (<http://www.predictprotein.org>) (ROST et al., 2004) foi utilizado para comparar a estrutura secundária da proteína referência E6 HPV-6vc com a estrutura secundária da proteína E6 HPV-6vc mutada.

#### **4.12. Análise Filogenética**

A análise filogenética foi realizada utilizando a ferramenta PhyML disponível online na Plataforma de Bioinformática do Sul da França (*South of France Bioinformatics Platform*- <http://www.atgc-montpellier.fr/phyml>) (GUINDON e GASCUEL, 2003; GUINDON et al., 2010). O modelo de substituição utilizado na reconstrução filogenética foi estimado com o auxílio do programa Modeltest 3.7 (POSADA e CRANDALL, 1998) hospedado no in PAUP 4.0 beta10 (SWOFFORD, 2002). A árvore filogenética foi reconstruída pelo Método *Maximum- Likelihood* (ML) utilizando o modelo TrN para as sequências de HPV-6 e o modelo HKY85 para as sequências de HPV-11. *Bootstrap* foi calculado com 1.000 réplicas e valores acima de 70% foram considerados significativos.

Para as análises filogenéticas, nós incluímos todas as 25 sequências da região E6 obtidas neste estudo, adicionalmente a outras sequências da E6 completa reportadas previamente: 77 sequências da Eslovênia (HPV-6) (KOCJAN et al., 2009), 12 sequências da África do Sul (HPV-6) (COMBRINCK et al., 2011) e 63 sequências da Eslovênia (HPV-11) (MAVER et al., 2011). Essas amostras foram isoladas de diferentes sítios anatômicos (papiloma de laringe, verrugas genitais, câncer cervical, esfregaço anal).

## **5. Resultados**

### **5.1. Caracterização das amostras**

Foi analisada a região genômica E6 de amostras de HPV-6 e -11 provenientes de Ribeirão Preto. A população de estudo foi composta de 25 pacientes, sendo 11 pacientes (45%) diagnosticados com papilomatose respiratória juvenil e 13 (55%) pacientes com papilomatose respiratória adulta. Dos pacientes analisados, 66% eram do sexo masculino e 34% eram do sexo feminino. Informações dos pacientes, incluindo o estado clínico e o número de procedimentos cirúrgicos realizado está apresentado na Tabela 3. A doença foi classificada como severa quando foram realizados mais de 3 procedimentos cirúrgicos por ano e os valores da escala de Derkay foram maiores do que 20 (COMBRINCK et al., 2011).

**Tabela 3:** Caracterização das amostras.

Tipo de HPV	Amostra	Sexo	Idade ao diagnóstico	Idade no último acompanhamento (ano)	Total de procedimentos desde o diagnóstico	Média de procedimentos/ano	Escala Derkay	Severidade da doença
HPV-6	BR_LP1	F	51	51	1	1	08	Moderada
	BR_LP2	F	4	4	3	3	13	Moderada
	BR_LP3	F	3	5	9	4.5	17	Moderada
	BR_LP4	***	***	***	***	***	***	***
	BR_LP5	M	1	6	10	2	16	Moderada
	BR_LP6	F	5	8	6	2	26	Moderada
	BR_LP7	F	5	6	5	5	15	Moderada
	BR_LP8	M	23	25	2	1	07	Moderada
	BR_LP9	M	30	36	4	0.7	07	Moderada
	BR_LP10	M	32	33	2	2	07	Moderada
	BR_LP11	M	Recém-nascido	1	4	4	16	Moderada
	BR_LP12	M	28	28	2	2	13	Moderada
	BR_LP13	M	32	32	1	1	10	Moderada
	BR_LP14	F	8	8	1	1	13	Moderada
	BR_LP15	M	41	42	3	3	11	Moderada
	BR_LP16	M	47	47	1	1	13	Moderada
	BR_LP17	M	31	31	3	3	10	Moderada
	BR_LP18	M	45	46	3	3	05	Moderada
HPV-11	BR_LP19	M	7	13	22	3.7	22	Severa
	BR_LP20	F	2	3	6	6	21	Severa
	BR_LP21	F	2	5	9	3	15	Moderada
	BR_LP22	M	2	5	1	0.3	06	Moderada
	BR_LP23	M	3	3	2	2	20	Moderada
	BR_LP24	M	29	31	5	2.5	31	Moderada
	BR_LP25	M	33	33	4	1	04	Moderada

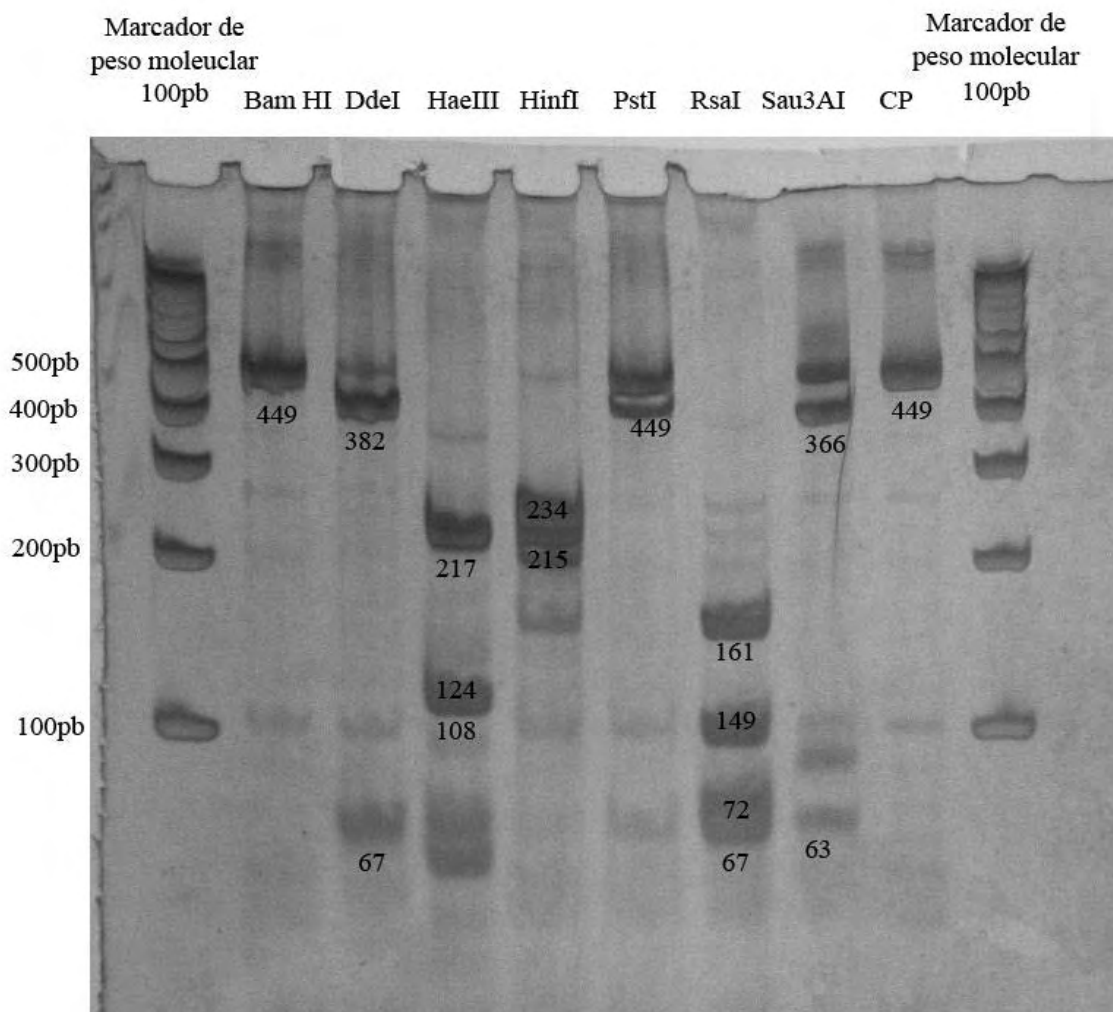
\*\*\* dados indisponíveis

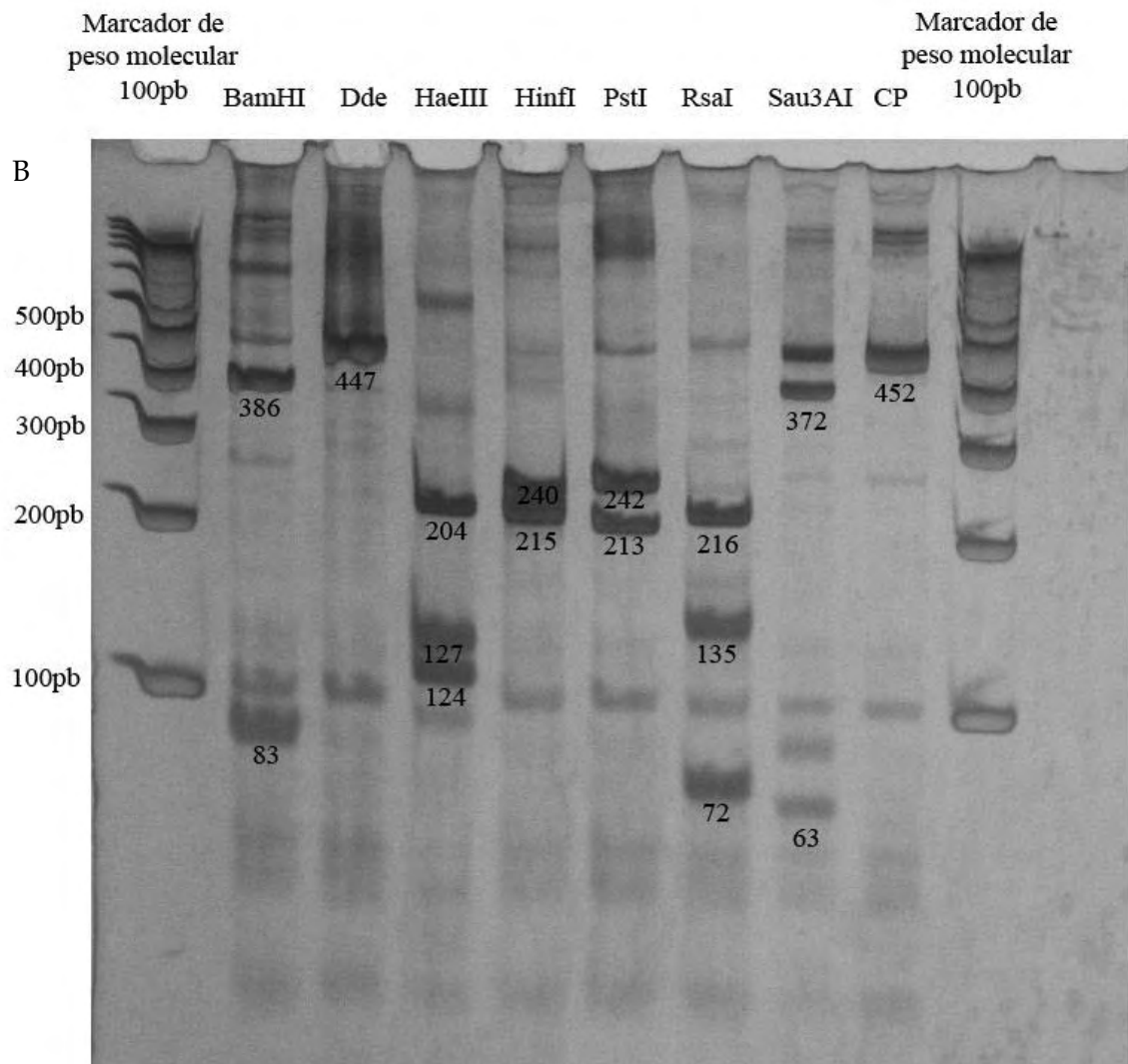
## 5.2. Detecção de HPV e Genotipagem

O DNA do HPV foi detectado em 100% (25/25) das amostras analisadas, sendo 72% (18/25) das amostras genotipadas como HPV-6 e 28% (7/25) como HPV-11(Figura 6).

A região E6 do HPV foi amplificada nas 25 amostras, onde um fragmento de 562 pb foi gerado para as amostras HPV-6 e outro com 635 pb foi gerado para as amostras HPV-11.

A

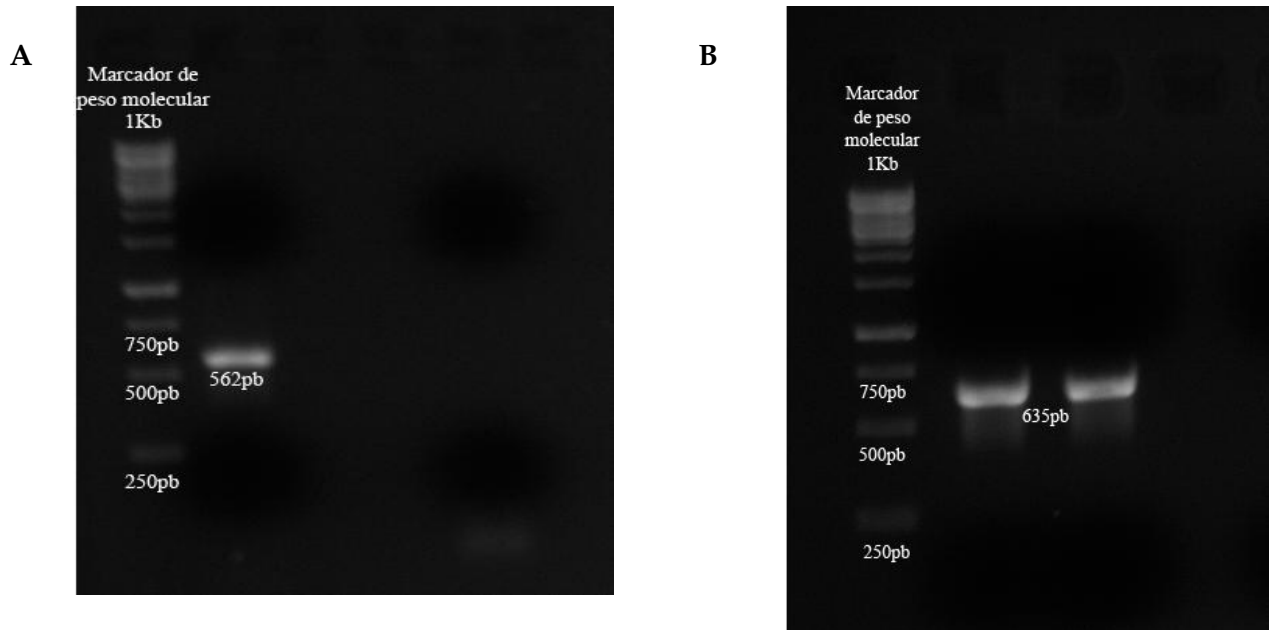




**Figura 6:** Genotipagem do HPV por RFLP. Gel de poliacrilamida corado com prata. A) Perfil de bandas de uma amostra HPV-6. B) Perfil de bandas de uma amostra HPV-11. C.P: Controle positivo; amostra de DNA não digerido pelas enzimas de restrição que apresenta 452 pb. Para a genotipagem, foram consideradas somente as banda com marcação mais forte. O número de pares de bases de cada banda analisada está localizada em baixo de cada banda.

### 5.3. Amplificação de E6

Para todas as 18 amostras genotipadas como HPV-6 foi amplificado um fragmento de 562 pb (Figura 7A) e para as 7 amostras HPV-11 foi amplificado um fragmento de 635pb (Figura 7B) correspondente a região genômica E6.



**Figura 7:** Produto amplificado correspondente a região genômica E6, visualizado em gel de agarose e brometo de etídeo submetidos à luz ultravioleta. A) Amostra genotipada como HPV-6. B) Amostra genotipada como HPV-11. 1Kb – marcador molecular.

#### 5.4. Variantes Genômicas da região E6

A classificação das variantes genômicas de HPV-6 foi baseada na comparação com a sequência protótipo HPV-6b (Número de acesso no GenBank X00203) e com as sequências não-protótipo HPV-6a (Número de acesso no GenBank: L41216) e HPV-6vc (Número de acesso no GenBank: AF092932). As variantes genômicas de HPV-11 foram caracterizadas por comparação das sequências obtidas com a sequência protótipo do HPV-11 (Número de acesso no GenBank: M14119).

Dentre as 18 amostras (isolados) de HPV-6 analisadas, cinco isolados (27,8%) mostraram alta identidade com a sequência não-protótipo HPV-6a, 12 (66,7%) isolados apresentaram alta identidade com a sequência protótipo HPV-6vc, e um isolado apresentou alta identidade com a sequência protótipo HPV-6b. No total foram identificadas quatro variantes genômicas do gene E6 (Figura 8A). A comparação das sequências do gene E6 completo com a sequência referência HPV-6b revelou duas mutações pontuais sinônimas: A120T e G372A.

Cinco isolados de HPV-6 foram idênticos à sequência referência HPV-6a com exceção da mutação G372A detectada em todas as cinco sequências. A substituição nucleotídica A296G foi detectada em 16,6% (2/12) dos isolados relacionados com a sequência referência HPV-6vc (BR\_LP14 e BR\_LP16). Esta substituição resultou na troca de um aspartato por uma glicina, que corresponde a uma alteração em 0,66% da proteína E6. A variação

nucleotídica máxima observada entre as variantes e as sequências referência foi de dois nucleotídeos (0,44% do gene).

Duas variantes distintas de HPV-11 foram identificadas: a protótipo e a BR\_LP19 (Figura 8B). A variante detectada é caracterizada por duas substituições nucleotídicas sinônimas (T36C; C279T).

Os 18 pacientes positivos para HPV-6 e os 5 pacientes HPV-11 apresentaram a doença na sua forma moderada. A doença em sua forma severa foi observada somente em dois pacientes infectados por HPV-11 (BR\_LP19 e BR\_LP20). Esses pacientes apresentaram infecção por variantes diferentes.

A

HPV-6		Posições nucleotídicas					Número de amostras	Severidade da doença	
		1	2	2	2	3		Moderada	Severa
		2	9	9	9	7			
		0	5	6	7	2			
6b	Ref. 6b	A	G	A	C	G			
	BR_LP12	T				A	1	1	
6a	Ref. 6a	T							
	BR_LP8; BR_LP9; BR_LP10; BR_LP13; BR_LP915					A	5	5	
6vc	Ref. 6vc	T				A	10	10	
	BR_LP14; BR_LP16			G			2	2	
	Códon			9					
				9					
	Protótipo aa			D					
	Mutada aa			G					



B

HPV-11	Posições nucleotídicas		Número de amostras	Severidade da doença	
	0	2		Moderada	Severa
	3	7			
	6	9			
Ref. HPV11	T	C	4	3	1
BR_LP19; BR_LP21; BR_LP24	C	T	3	2	1

**Figura 8:** Variabilidade Genética do Gene E6 de isolados de HPV-6 (A) e HPV-11 (B). No topo, as posições genômicas nucleotídicas contendo mutações são indicadas verticalmente. Em cinza, nucleotídeos conservados em relação à sequência protótipo. Abaixo, são indicadas as posições dos códons e troca de aminoácidos (aa) em comparação com a sequência referência HPV-6vc. A coluna “número de amostras” indica o número de isolados idênticos às variantes especificadas em cada linha. A última coluna relaciona o número de isolados com a severidade da doença. Os nucleotídeos nas posições 295, 296 e 297 do HPV-6 representam o códon completo que codifica o aminoácido na posição 99. D: aspartato; G: glicina.

### 5.5. Análise da estrutura secundária

A substituição nucleotídica A296G foi detectada nos isolados relacionados com a sequência referência HPV-6vc e resultou na troca de um aspartato por uma glicina (D99G). Os aminoácidos aspartato e glicina apresentam propriedades físico-químicas diferentes, pois o aspartato é um aminoácido polar enquanto que a glicina é apolar. As análises *in silico* mostraram uma alteração na composição da estrutura secundária da proteína E6 HPV-6vc mutada em comparação com a sequência referência. Analisando a sequência referência HPV-6vc a porcentagem de estruturas folha- $\beta$  e *coil* foram de 13,3% e 30,0%, respectivamente, e para a sequência mutada as porcentagens foram de 14,67 e 34,67%. Não foi observada divergência na porcentagem de estruturas  $\alpha$ -hélice entre as variantes.

### 5.6. Análise Filogenética

#### 5.6.1. HPV-6

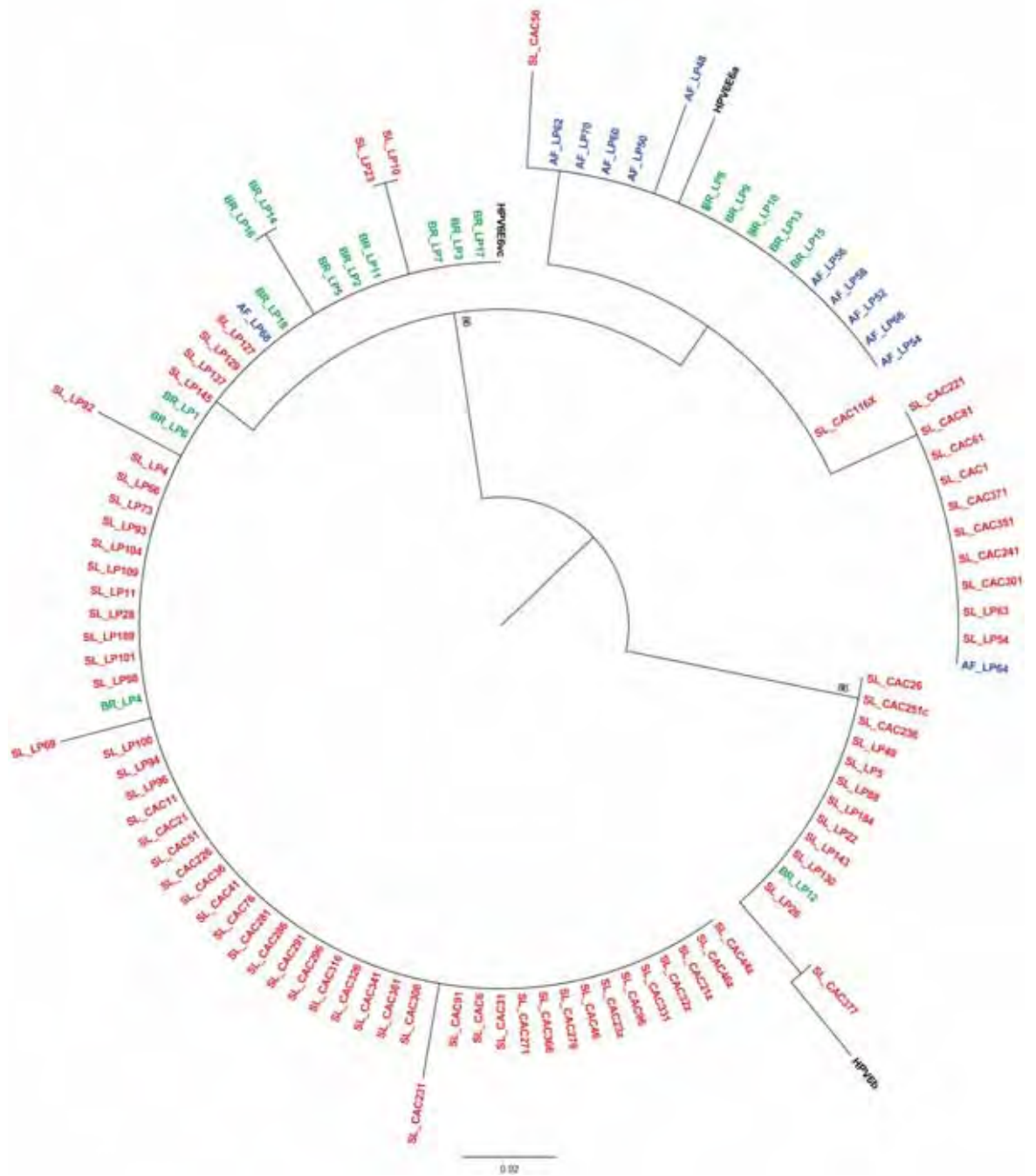
A análise filogenética incluiu todas as 18 sequências de HPV-6 E6 obtidas neste estudo além de sequências de E6 descritas por Kocjan et al. (KOCJAN et al., 2009) (n=77) e Combrink et al. (COMBRINCK et al., 2011) (n=12).

A árvore filogenética segregou em dois ramos principais (Figura 9). A sequência protótipo HPV-6b e os 13 isolados relacionados a esta sequência referência agruparam-se em um ramo monofilético. O segundo ramo principal foi subdividido em dois ramos: um que agrupou as sequências HPV-6a relacionadas e outro com as sequências HPV-6vc relacionadas. As 18 sequências de HPV-6 descrita neste estudo não se agruparam em um

ramo monofilético. Observou-se que as sequências não se agruparam de acordo com sua origem geográfica e nem de acordo com o sítio anatômico da infecção.

### **5.6.2. HPV-11**

A árvore filogenética foi reconstruída incluindo as sete sequências de HPV-11 E6 obtidas neste trabalho. Adicionalmente nós incluímos sequências de 63 amostras obtidas na Eslovênia (MAVER et al., 2011). Como observado na árvore filogenética gerada com as sequências de HPV-6, as sequências de HPV-11 do Brasil não se agruparam em um ramo monofilético (Figura 10).



**Figura 9:** Árvore Filogenética não-enraizada das variantes de HPV-6 originadas da Eslovênia (vermelha), Brasil (verde), África (azul) e sequência referência (preto). A árvore foi construída utilizando-se o método Maximum-Likelihood com o modelo de substituição TrN. Valores de bootstrap obtidos com 1000 réplicas. Valores acima de 70% foram considerados significantes. O prefixo de cada isolado representa o sítio anatômico da infecção. (CAC: condiloma acuminata; LP: papilomatose de laringe).



**Figura 10:** Árvore Filogenética não-enraizada das variantes de HPV-6 originadas da Eslovênia (vermelha), Brasil (verde), e Sequência referência (preto). A árvore foi construída utilizando-se o método Maximum-Likelihood com o modelo de substituição HKY85. Valores de bootstrap obtidos com 1000 réplicas. Valores acima de 70% foram considerados significantes. O prefixo de cada isolado representa o sítio anatômico da infecção. (CAC: condiloma acuminata; LP: papilomatose de laringe; CS: Esfregaço cervical; A: Esfregaço anal).

## 6. Discussão

O HPV está bem estabelecido como o agente etiológico da Papilomatose Respiratória. O DNA do HPV foi detectado em 100% das amostras analisadas neste trabalho. Em diversos estudos o HPV-6 tem sido detectado em maior proporção do que o HPV-11 (WIATRAK et al., 2004; MANJARREZ et al., 2006). O trabalho realizado por Buchinsky et al. (2008) identificou o HPV-6 em 60% das amostras e em 40% foi encontrado HPV-11. Nossos resultados estão de acordo com a literatura, já que o HPV-6 foi detectado em 72% das amostras e o HPV-11 em 28%.

Tem sido descrito que os pacientes com papilomatose respiratória adulta tiveram mais parceiros sexuais durante a vida, apresentando mais contatos orogenitais do que a população controle sem papilomatose de laringe (KASHIMA et al., 1992). Assim, acredita-se que a papilomatose adulta seja transmitida pelo contato orogenital, pois a PRR e os condilomas genitais são causados pelos HPVs dos tipos 6 e 11 sendo o HPV-6 o mais prevalente em ambas as doenças (CAPPER et al., 1983; GREER et al., 1990). Os resultados do presente estudo corroboram com a literatura citada acima, pois 58,8% das amostras HPV-6 analisadas pertenciam a pacientes com papilomatose adulta, já para as amostras HPV-11 esse número foi de 42%.

A proteína E6 do HPV tem sido descrita como uma proteína intrinsecamente desordenada, o que implica que pequenas alterações podem impactar fortemente sua estrutura terciária e sua função (UVERSKY et al., 2006; DONNE et al., 2010). De fato, a influência da variabilidade nucleotídica de E6 sobre o potencial oncogênico foi descrita a mais de uma década atrás (STOPPLER et al., 1996). Diferenças na capacidade de transformação de E6 foram observadas mesmo entre os tipos de HPV de alto risco (VILLA e SCHLEGEL, 1991), e em um nível mais refinado, entre variantes moleculares de HPV-16 (RICHARD et al., 2010; SICHERO et al., 2012). Entretanto, observou-se que a atividade de imortalização de E6 em cooperação com a E7, em HPV-16, não pôde ser substituída pela atividade da E6 do HPV-6 (HALBERT et al., 1991).

Neste estudo nós descrevemos a diversidade do gene precoce E6 de HPV-6 e HPV-11 isolados de biópsia de 25 pacientes diagnosticados com papilomatose respiratória recorrente. Este estudo é a investigação mais extensiva sobre a diversidade nucleotídica de HPVs de baixo risco no Brasil. As sequências obtidas neste trabalho foram comparadas com a sequência protótipo HPV-6b e com as sequências não-protótipos HPV-6a e HPV-6vc. Foram identificadas quatro variantes moleculares de E6 de HPV-6, das quais apenas uma variante apresentou troca de aminoácido. Esta alteração foi descrita pela primeira vez neste estudo e

uma análise mais detalhada é necessária para determinar as implicações funcionais desta variação. Usando ferramentas de bioinformática, será importante analisar a estrutura terciária da variante que apresentou a mutação D99G, para avaliar possíveis alterações na estrutura da proteína ou em sua função resultantes da troca de aminoácido.

A proteína viral E2 é a principal reguladora da transcrição dos genes virais e afeta a expressão viral ligando-se a elementos específicos na LCR. Além disso, E2 está envolvida na replicação do DNA viral e interage e recruta E1 para a origem de replicação. Assim, é razoável supor que mutações nessas regiões podem afetar o resultado clínico da infecção. Entre as variantes moleculares de HPV-16, a influência da variabilidade de E2 no potencial de transativação transcricional tem sido descrito. Observou-se também que variantes específicas de HPV-16 exibem eficiências de replicação menores do que outras (SICHERO e VILLA, 2006).

Embora apenas o gene *E6* de HPV-6 e HPV-11 foi sequenciado neste estudo, podemos presumir que as sequências nucleotídicas de E2 e E1 destes isolados podem apresentar uma forte co-variação intergênica observada em HPV e a sequência completa do genoma viral de diversas variantes destes tipos virais estão disponíveis para análise (BURK et al., 2011). No entanto, não foram realizadas análises funcionais para essas proteínas, impossibilitando quaisquer conclusões sobre o impacto da variabilidade observada na transcrição viral e replicação.

Entre os indivíduos analisados, somente dois foram diagnosticados com a forma severa da doença: BR\_LP19 e BR\_LP20. Ambos os pacientes foram positivos para o HPV-11, resultado que concorda com a opinião de diversos otorrinolaringologistas que acreditam que HPV-11 está associado com casos da doença em sua forma mais agressiva em comparação com casos HPV-6 positivos (WIATRAC et al., 2004). Contudo, o pequeno número de amostras analisadas neste estudo impede que se estabeleça qualquer relação da severidade da doença com sequências específicas do gene *E6*.

Neste trabalho, foram detectadas quatro substituições nucleotídicas diferentes que não resultaram em troca de aminoácido. Apesar das mutações sinônimas não refletirem em alterações na composição de aminoácidos da proteína, representam um aspecto importante na evolução dos papilomavirus (PV) devido ao forte viés de uso de códons (ZHOU et al., 1999; ZHAO et al., 2003; ZHAO e CHEN, 2011).

A preferência no uso de códons é direcionada pela co-evolução com os hospedeiros para adaptação à resposta imune e tropismo dos tecidos (ZHAO e CHEN, 2011). Curiosamente, a preferência no uso de códons observada em PV é significativamente

diferente da observada para proteínas de mamíferos, o que permite que o vírus utilize tRNAs que são usados com menor frequência (WADA et al., 1990; ZHOU et al., 1999). Essa estratégia também evita que a síntese de proteínas do hospedeiro seja prejudicada, o que é importante para a produção das proteínas virais (ARAGONES et al., 2010).

Duas mutações sinônimas encontradas neste estudo, uma encontrada em HPV-6 e outra em HPV-11, resultaram na troca de um códon preferido por genes humanos para um utilizado com maior frequência pelos papilomavírus (HPV-6 – A120T e HPV-11 – C279T). De maneira recíproca, uma substituição sinônima encontrada em HPV-11 alterou o códon encontrado com maior frequência em PV para um utilizado mais frequentemente durante a síntese de proteínas humanas (HPV-11 – T36C). Estudos onde os códons raros foram convertidos para aqueles usados com maiores frequências por mamíferos mostraram um aumento de 100 vezes nos níveis de expressão da proteína, enquanto que os níveis de mRNA mantiveram-se constantes (CID-ARREGUI et al., 2003; DISBROW et al., 2003; MOSSADEGH et al., 2004). Estudos adicionais mostraram que os níveis de expressão estão relacionados com a abundância de tRNA (GU et al., 2004). Para determinar se as mutações sinônimas aqui descritas tem algum impacto na expressão da proteína E6, estudos adicionais são necessários. Observou-se que diferenças na sequência de aminoácidos do gene E5 de HPV-16 não pode ser associada com o aumento do risco de neoplasia cervical. Contudo, foi observado que essas variantes de E5 apresentam uma utilização significativamente maior de códons preferidos por genes de mamíferos (BIBLE et al., 2000). O uso preferencial desses códons pode conferir para essas variantes uma vantagem de crescimento, uma vez que sugere-se que o uso de códons pode ser importante na regulação das proteínas precoces do HPV (HSIEH et al., 2000).

A maioria dos isolados identificados neste estudo possuem sequências idênticas às sequências descritas anteriormente, obtidas de espécimes de papilomatose de laringe e condiloma acuminado originários da Eslovênia e da África (KOCJAN et al., 2009; COMBRINCK et al., 2011). A análise comparativa das sequências revelou que 12,35% e 10,1% dos isolados descritos por Kocjan et al. (2009) e Combrinck et al. (2011) eram idênticos a variante BR\_LP12 e a BR\_LP8, respectivamente. Adicionalmente, entre as 63 sequências caracterizadas por Maver et al. (2011), 82,5% eram idênticas à variante BR\_LP19 descrita neste trabalho. Maver et al. (2011) avaliou a diversidade de nucleotídeos do HPV-11 em 63 isolados e identificou seis variantes moleculares de E6, das quais apenas uma variante apresentou troca de aminoácido. Consistentemente, nós também observamos baixa diversidade do gene E6 em HPV-11.

Nas análises filogenéticas dos isolados de HPV-6 e HPV-11 não foi observado o agrupamento geográfico das sequências. O mesmo padrão foi descrito por Kocjan et al. (2009), sugerindo fortemente que as variantes de HPV-6 e HPV-11 são detectadas com prevalências similares em todo o mundo. Além disso, a análise filogenética de um segmento de 252 pb da LCR de 62 isolados obtidos em diversas partes do mundo (Brasil, Alemanha, Índia, Itália, Senegal e Cingapura) revelou que a distribuição das variantes de HPV-6 e HPV-11 mostra pouca correlação com a sua origem geográfica e a etnia da população estudada (HEINZEL et al., 1995).

Diferentemente, a análise nucleotídica de isolados de HPV-16 e HPV-18 obtidos em diversas regiões do mundo aponta para uma co-evolução desses tipos virais com os três principais grupos étnicos: Africanos, Caucasianos e Asiáticos. Em contraste às análises filogenéticas de HPV-6 e HPV-11, as variantes moleculares da LCR de HPV-16 e HPV-18 segregam-se robustamente em cinco principais linhagens de variantes: Europeia (E), Asiática (A), Asiática-Americana (AA), e duas linhagens Africanas (Af1 e Af2) (HO et al., 1993; ONG et al., 1993). A distribuição das variantes de HPV-16 ao redor do mundo varia significativamente e está correlacionada com o nível intrínseco de miscigenação de cada população. De fato, análises de 18 isolados de HPV-16 e HPV-18 detectados no Brasil refletem a história da colonização do Brasil por Europeus e Africanos (SICHERO et al., 2007).

Infelizmente o pequeno número de amostras analisadas não permitiu uma avaliação da associação entre variantes moleculares específicas com o sítio anatômico da infecção. Contudo, Heinzl et al. (1995) não encontraram nenhuma associação das variantes de HPV-6 e HPV-11 com sítios anatômicos de infecção específicos. Em contraste, Du et al. (2012) observaram uma distribuição desigual de variantes de HPV-16 entre câncer cervical e câncer de tonsila.

Observou-se uma taxa de substituições não-sinônimas de 25% (1/4 de substituição de nucleotídeos resultou em troca de aminoácido) para as amostras HPV-6, e não foi observado troca de aminoácido nas amostras de HPV-11. Entretanto, Vrtacnik Bokal et al. (2010) e Shang et al. (2011) encontraram uma taxa de variação de aminoácido de 62,5% (10/16) e 57,69% (30/52) para E6 de HPV-16.

Pelo exposto, observa-se que as sequências dos HPVs de baixo risco apresentaram baixa variabilidade genética, sendo identificadas apenas quatro variantes de E6 em sequências de HPV-6 e duas variantes para HPV-11. Não foi possível estabelecer uma associação



geográfica entre as amostras de HPV-6 ou HPV-11. Estudos funcionais serão necessários para avaliar a influência da diversidade genética na replicação e expressão do vírus.

## 7. Conclusões

- As sequências de E6 do HPV-6 e HPV-11 apresentaram baixa diversidade genética.
- No total foram identificadas quatro variantes genômicas de HPV-6 e duas de HPV-11, mas não foi possível correlacionar a severidade da doença com nenhuma variante específica.
- Foi detectada uma variante nova para HPV-6 que resultou em troca de aminoácidos.
- A troca de aminoácido resultou em alterações na estrutura secundária da proteína E6 de HPV-6.
- As filogenias de HPV-6 e HPV-11 demonstraram que as sequências com mesma origem geográfica não se agruparam em ramos monofiléticos.
- As variantes de HPV-6 e de HPV-11 são encontradas com prevalências similares ao redor do mundo.

## 8. Referências Bibliográficas

AALTONEN, L. M.; RIIKANEN, H.; VAHERI, A. Human papillomavirus in larynx. **Laryngoscope**, v. 112, n. 4, p. 700-7, Apr 2002.

AHO, J.; HANKINS, C.; TREMBLAY, C. et al. Molecular analysis of human papillomavirus type 52 isolates detected in the genital tract of human immunodeficiency virus-seropositive and -seronegative women. **J Infect Dis**, v. 188, n. 10, p. 1517-27, Nov 15 2003.

ARAGONES, L.; GUIX, S.; RIBES, E. et al. Fine-tuning translation kinetics selection as the driving force of codon usage bias in the hepatitis A virus capsid. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 3, p. e1000797, Mar 2010.

ARMSTRONG, L. R.; DERKAY, C. S.; REEVES, W. C. Initial results from the national registry for juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. RRP Task Force. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 125, n. 7, p. 743-8, Jul 1999.

BAUER, H. M.; GREER, C. E.; MANOS, M. M. Determination of genital human papillomavirus infection using consensus PCR. In: HERRINGTON, C. S. e MCGEE, J. O. D. (Ed.). **Diagnostic molecular pathology: a practical approach**: Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 1992. p.132–152.

BENNETT, M. D.; REISS, A.; STEVENS, H. et al. The first complete papillomavirus genome characterized from a marsupial host: a novel isolate from *Bettongia penicillata*. **J Virol**, v. 84, n. 10, p. 5448-53, May 2010.

BERNARD, H. U. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. **Antivir Ther**, v. 7, n. 4, p. 219-37, Dec 2002.

BERNARD, H. U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. **J Clin Virol**, v. 32 Suppl 1, p. S1-6, Mar 2005.

BERNARD, H. U.; BURK, R. D.; CHEN, Z. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70-9, May 25 2010.

BERNARD, H. U.; CALLEJA-MACIAS, I. E.; DUNN, S. T. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. **Int J Cancer**, v. 118, n. 5, p. 1071-6, Mar 1 2006.

BERNARD, H. U.; CHAN, S. Y.; MANOS, M. M. et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification,

restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. **J Infect Dis**, v. 170, n. 5, p. 1077-85, Nov 1994.

BIBLE, J. M.; MANT, C.; BEST, J. M. et al. Cervical lesions are associated with human papillomavirus type 16 intratypic variants that have high transcriptional activity and increased usage of common mammalian codons. **J Gen Virol**, v. 81, n. Pt 6, p. 1517-27, Jun 2000.

BRANDWEIN-GENSLER, M.; VAN DE WATER, T. R. Laryngeal papillomatosis. **Otolaryngology: basic science and clinical review**, 2006.

BUCHINSKY, F. J.; DONFACK, J.; DERKAY, C. S. et al. Age of child, more than HPV type, is associated with clinical course in recurrent respiratory papillomatosis. **PLoS One**, v. 3, n. 5, p. e2263, 2008.

BURK, R. D.; CHEN, Z.; HARARI, A. et al. Classification and nomenclature system for human Alphapapillomavirus variants: general features, nucleotide landmarks and assignment of HPV6 and HPV11 isolates to variant lineages. **Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat**, v. 20, n. 3, p. 113-23, Sep 2011.

CAMARA, G. N.; CERQUEIRA, D. M.; OLIVEIRA, A. P. et al. Prevalence of human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions in the Federal District of Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7, p. 879-83, Oct 2003.

CAMPISI, P.; HAWKES, M.; SIMPSON, K. The epidemiology of juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis derived from a population level national database. **Laryngoscope**, v. 120, n. 6, p. 1233-45, Jun 2010.

CAPPER, J. W.; BAILEY, C. M.; MICHAELS, L. Squamous papillomas of the larynx in adults. A review of 63 cases. **Clin Otolaryngol Allied Sci**, v. 8, n. 2, p. 109-19, Apr 1983.

CARROLL, C. D.; SAUNDERS, N. C. Respiratory papillomatosis: a rare cause of collapse in a young adult presenting to the emergency department. **Emerg Med J**, v. 19, n. 4, p. 362-5, Jul 2002.

CASON, J.; MANT, C. A. High-risk mucosal human papillomavirus infections during infancy & childhood. **J Clin Virol**, v. 32 Suppl 1, p. S52-8, Mar 2005.

CASTELLSAGUE, X.; DRUDIS, T.; CANADAS, M. P. et al. Human Papillomavirus (HPV) infection in pregnant women and mother-to-child transmission of genital HPV genotypes: a prospective study in Spain. **BMC Infect Dis**, v. 9, p. 74, 2009.

CHAN, P. K.; LAM, C. W.; CHEUNG, T. H. et al. Association of human papillomavirus type 58 variant with the risk of cervical cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 94, n. 16, p. 1249-53, Aug 21 2002.

CHEN, Z.; TERAJ, M.; FU, L. et al. Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses. **J Virol**, v. 79, n. 11, p. 7014-23, Jun 2005.

CHOW, L. T.; BROKER, T. R.; STEINBERG, B. M. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. **APMIS**, v. 118, n. 6-7, p. 422-49, Jun 2010.

CID-ARREGUI, A.; JUAREZ, V.; ZUR HAUSEN, H. A synthetic E7 gene of human papillomavirus type 16 that yields enhanced expression of the protein in mammalian cells and is useful for DNA immunization studies. **J Virol**, v. 77, n. 8, p. 4928-37, Apr 2003.

COHN, A. M.; KOS, J. T., 2ND; TABER, L. H. et al. Recurring laryngeal papilloma. **Am J Otolaryngol**, v. 2, n. 2, p. 129-32, May 1981.

COMBRINCK, C. E.; SEEDAT, R. Y.; RANDALL, C. et al. Novel HPV-6 variants of human papillomavirus causing recurrent respiratory papillomatosis in southern Africa. **Epidemiol Infect**, p. 1-7, Aug 30 2011.

CROOK, T.; TIDY, J. A.; VOUSDEN, K. H. Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. **Cell**, v. 67, n. 3, p. 547-56, Nov 1 1991.

DARTMANN, K.; SCHWARZ, E.; GISSMANN, L. et al. The nucleotide sequence and genome organization of human papilloma virus type 11. **Virology**, v. 151, n. 1, p. 124-30, May 1986.

DAS, P.; THOMAS, A.; MAHANTSHETTY, U. et al. HPV genotyping and site of viral integration in cervical cancers in Indian women. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41012, 2012.

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**, v. 7, n. 7, p. 453-9, Jul 2007.

DE VILLIERS, E. M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17-27, Jun 20 2004.

DE VILLIERS, E. M.; GISSMANN, L.; ZUR HAUSEN, H. Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. **J Virol**, v. 40, n. 3, p. 932-5, Dec 1981.

DERKAY, C. S. Task force on recurrent respiratory papillomas. A preliminary report. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 121, n. 12, p. 1386-91, Dec 1995.

DERKAY, C. S. Recurrent respiratory papillomatosis. **Laryngoscope**, v. 111, n. 1, p. 57-69, Jan 2001.

DERKAY, C. S.; BUCHINSKY, F. J. Preventing recurrent respiratory papillomatosis and other HPV-associated head and neck diseases with prophylactic HPV vaccines. **Am Acad Otol Head Neck Surg Bulletin**, v. 26, p. 60-61, 2007.

DERKAY, C. S.; MALIS, D. J.; ZALZAL, G. et al. A staging system for assessing severity of disease and response to therapy in recurrent respiratory papillomatosis. **Laryngoscope**, v. 108, n. 6, p. 935-7, Jun 1998.

DERKAY, C. S.; WIATRAK, B. Recurrent respiratory papillomatosis: a review. **Laryngoscope**, v. 118, n. 7, p. 1236-47, Jul 2008.

DICKENS, P.; SRIVASTAVA, G.; LOKE, S. L. et al. Human papillomavirus 6, 11, and 16 in laryngeal papillomas. **J Pathol**, v. 165, n. 3, p. 243-6, Nov 1991.

DISBROW, G. L.; SUNITHA, I.; BAKER, C. C. et al. Codon optimization of the HPV-16 E5 gene enhances protein expression. **Virology**, v. 311, n. 1, p. 105-14, Jun 20 2003.

DONNE, A. J.; CLARKE, R. Recurrent respiratory papillomatosis: an uncommon but potentially devastating effect of human papillomavirus in children. **Int J STD AIDS**, v. 21, n. 6, p. 381-5, Jun 2010.

DONNE, A. J.; HAMPSON, L.; HE, X. T. et al. Effects of cidofovir on a novel cell-based test system for recurrent respiratory papillomatosis. **Head Neck**, v. 29, n. 8, p. 741-50, Aug 2007.

DONNE, A. J.; HAMPSON, L.; HOMER, J. J. et al. The role of HPV type in Recurrent Respiratory Papillomatosis. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 74, n. 1, p. 7-14, Jan 2010.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **J Clin Virol**, v. 32 Suppl 1, p. S7-15, Mar 2005.

DOYLE, D. J.; GIANOLI, G. J.; ESPINOLA, T. et al. Recurrent respiratory papillomatosis: juvenile versus adult forms. **Laryngoscope**, v. 104, n. 5 Pt 1, p. 523-7, May 1994.

DRAGANOV, P.; TODOROV, S.; TODOROV, I. et al. Identification of HPV DNA in patients with juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis using SYBR Green real-time PCR. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 70, n. 3, p. 469-73, Mar 2006.

DU, J.; NORDFORS, C.; NASMAN, A. et al. Human papillomavirus (HPV) 16 E6 variants in tonsillar cancer in comparison to those in cervical cancer in Stockholm, Sweden. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e36239, 2012.

EDWARDS, S.; CARNE, C. Oral sex and the transmission of viral STIs. **Sex Transm Infect**, v. 74, n. 1, p. 6-10, Feb 1998.

ELGUI DE OLIVEIRA, D. DNA viruses in human cancer: An integral overview of fundamental mechanisms of viral oncogenesis. **Cancer letters**, v. 247, p. 182-196, 2007.

EVANS, J. N. Recurrent Respiratory Papillomatosis. In: (Ed.). **W. G. Scott-Brown's Otolaryngology**. 6th: Butterworth-Heinemann Ltd, v.4, 1996. cap. 23, p.1-5.

FRANCO, E. L.; HARPER, D. M. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. **Vaccine**, v. 23, n. 17-18, p. 2388-94, Mar 18 2005.

FRAZER, I. H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 1, p. 46-54, Jan 2004.

GALLAGHER, T. Q.; DERKAY, C. S. Recurrent respiratory papillomatosis: update 2008. **Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 16, n. 6, p. 536-42, Dec 2008.

GEREIN, V.; RASTORGUEV, E.; GEREIN, J. et al. Incidence, age at onset, and potential reasons of malignant transformation in recurrent respiratory papillomatosis patients: 20 years experience. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 132, n. 3, p. 392-4, Mar 2005.

GEREIN, V.; SCHMANDT, S.; BABKINA, N. et al. Human papilloma virus (HPV)-associated gynecological alteration in mothers of children with recurrent respiratory papillomatosis during long-term observation. **Cancer Detect Prev**, v. 31, n. 4, p. 276-81, 2007.

GEREIN, V.; SOLDATSKI, I. L.; BABKINA, N. et al. Children and partners of patients with recurrent respiratory papillomatosis have no evidence of the disease during long-term observation. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 70, n. 12, p. 2061-6, Dec 2006.

GERVAZ, P.; ALLAL, A. S.; VILLIGER, P. et al. Squamous cell carcinoma of the anus: another sexually transmitted disease. **Swiss Med Wkly**, v. 133, n. 25-26, p. 353-9, Jun 28 2003.

GISSMANN, L.; DIEHL, V.; SCHULTZ-COULON, H. J. et al. Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma. **J Virol**, v. 44, n. 1, p. 393-400, Oct 1982.

GISSMANN, L.; ZUR HAUSEN, H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (Condylomata acuminata). **Int J Cancer**, v. 25, n. 5, p. 605-9, May 15 1980.

GO, C.; SCHWARTZ, M. R.; DONOVAN, D. T. Molecular transformation of recurrent respiratory papillomatosis: viral typing and p53 overexpression. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, v. 112, n. 4, p. 298-302, Apr 2003.

GOMEZ, L. M.; MA, Y.; HO, C. et al. Placental infection with human papillomavirus is associated with spontaneous preterm delivery. **Hum Reprod**, v. 23, n. 3, p. 709-15, Mar 2008.

GOON, P.; SONNEX, C.; JANI, P. et al. Recurrent respiratory papillomatosis: an overview of current thinking and treatment. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v. 265, n. 2, p. 147-51, Feb 2008.

GRAVITT, P. E.; PEYTON, C. L.; ALESSI, T. Q. et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 1, p. 357-61, Jan 2000.

GREER, R. O., JR.; DOUGLAS, J. M., JR.; BREESE, P. et al. Evaluation of oral and laryngeal specimens for human papillomavirus (HPV) DNA by dot blot hybridization. **J Oral Pathol Med**, v. 19, n. 1, p. 35-8, Jan 1990.

GU, W.; LI, M.; ZHAO, W. M. et al. tRNASer(CGA) differentially regulates expression of wild-type and codon-modified papillomavirus L1 genes. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. 15, p. 4448-61, 2004.

GUINDON, S.; DUFAYARD, J. F.; LEFORT, V. et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Syst Biol**, v. 59, n. 3, p. 307-21, May 2010.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Syst Biol**, v. 52, n. 5, p. 696-704, Oct 2003.

HALBERT, C. L.; DEMERS, G. W.; GALLOWAY, D. A. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. **J Virol**, v. 65, n. 1, p. 473-8, Jan 1991.



HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series.**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HARCOURT, J. P.; WORLEY, G.; LEIGHTON, S. E. Cimetidine treatment for recurrent respiratory papillomatosis. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 51, n. 2, p. 109-13, Dec 5 1999.

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**, v. 364, n. 9447, p. 1757-65, Nov 13-19 2004.

HARTLEY, C.; HAMILTON, J.; BIRZGALIS, A. R. et al. Recurrent respiratory papillomatosis--the Manchester experience, 1974-1992. **J Laryngol Otol**, v. 108, n. 3, p. 226-9, Mar 1994.

HEINZEL, P. A.; CHAN, S. Y.; HO, L. et al. Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 7, p. 1746-54, Jul 1995.

HERBST, L. H.; LENZ, J.; VAN DOORSLAER, K. et al. Genomic characterization of two novel reptilian papillomaviruses, *Chelonia mydas* papillomavirus 1 and *Caretta caretta* papillomavirus 1. **Virology**, v. 383, n. 1, p. 131-5, Jan 5 2009.

HO, L.; CHAN, S. Y.; BURK, R. D. et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. **J Virol**, v. 67, n. 11, p. 6413-23, Nov 1993.

HOFMANN, K. J.; COOK, J. C.; JOYCE, J. G. et al. Sequence determination of human papillomavirus type 6a and assembly of virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. **Virology**, v. 209, n. 2, p. 506-18, Jun 1 1995.

HSIEH, C. H.; TSAO, Y. P.; WANG, C. H. et al. Sequence variants and functional analysis of human papillomavirus type 16 E5 gene in clinical specimens. **Arch Virol**, v. 145, n. 11, p. 2273-84, 2000.

HUIBREGTSE, J. M.; SCHEFFNER, M.; HOWLEY, P. M. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. **EMBO J**, v. 10, n. 13, p. 4129-35, Dec 1991.

IARC. Human papillomaviruses. **IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum**, v. 90, p. 1-636, 2007.

ICTV. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2011. Disponível em: < <http://www.ictvonline.org> >.

INSINGA, R. P.; DASBACH, E. J.; MYERS, E. R. The health and economic burden of genital warts in a set of private health plans in the United States. **Clin Infect Dis**, v. 36, n. 11, p. 1397-403, Jun 1 2003.

KASHIMA, H.; MOUNTS, P.; LEVENTHAL, B. et al. Sites of predilection in recurrent respiratory papillomatosis. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, v. 102, n. 8 Pt 1, p. 580-3, Aug 1993.

KASHIMA, H. K.; SHAH, F.; LYLES, A. et al. A comparison of risk factors in juvenile-onset and adult-onset recurrent respiratory papillomatosis. **Laryngoscope**, v. 102, n. 1, p. 9-13, Jan 1992.

KIYONO, T.; FOSTER, S. A.; KOOP, J. I. et al. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. **Nature**, v. 396, n. 6706, p. 84-8, Nov 5 1998.

KLOZAR, J.; TACHEZY, R.; ROTNAGLOVA, E. et al. Human papillomavirus in head and neck tumors: epidemiological, molecular and clinical aspects. **Wien Med Wochenschr**, v. 160, n. 11-12, p. 305-9, Jun 2010.

KOCJAN, B. J.; POLJAK, M.; CIMERMAN, M. et al. Pre vaccination genomic diversity of human papillomavirus genotype 6 (HPV 6). **Virology**, v. 391, n. 2, p. 274-83, Sep 1 2009.

KOUTSKY, L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. **Am J Med**, v. 102, n. 5A, p. 3-8, May 5 1997.

KOUTSKY, L. A.; AULT, K. A.; WHEELER, C. M. et al. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. **N Engl J Med**, v. 347, n. 21, p. 1645-51, Nov 21 2002.

KOVELMAN, R.; BILTER, G. K.; ROMAN, A. et al. Human papillomavirus type 6: classification of clinical isolates and functional analysis of E2 proteins. **J Gen Virol**, v. 80 ( Pt 9), p. 2445-51, Sep 1999.

LARSON, D. A.; DERKAY, C. S. Epidemiology of recurrent respiratory papillomatosis. **APMIS**, v. 118, n. 6-7, p. 450-4, Jun 2010.

LEVENTHAL, B. G.; KASHIMA, H. K.; WECK, P. W. et al. Randomized surgical adjuvant trial of interferon alfa-n1 in recurrent papillomatosis. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 114, n. 10, p. 1163-9, Oct 1988.

LIN, K.; DOOLAN, K.; HUNG, C. F. et al. Perspectives for preventive and therapeutic HPV vaccines. **J Formos Med Assoc**, v. 109, n. 1, p. 4-24, Jan 2010.

LINDEBERG, H.; ELBROND, O. Laryngeal papillomas: the epidemiology in a Danish subpopulation 1965-1984. **Clin Otolaryngol Allied Sci**, v. 15, n. 2, p. 125-31, Apr 1990.

LINDMAN, J. P.; LEWIS, L. S.; ACCORTT, N. et al. Use of the Pediatric Quality of Life Inventory to assess the health-related quality of life in children with recurrent respiratory papillomatosis. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, v. 114, n. 7, p. 499-503, Jul 2005.

LIU, Y.; CHEN, J. J.; GAO, Q. et al. Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells. **J Virol**, v. 73, n. 9, p. 7297-307, Sep 1999.

LONGUET, M.; BEAUDENON, S.; ORTH, G. Two novel genital human papillomavirus (HPV) types, HPV68 and HPV70, related to the potentially oncogenic HPV39. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 3, p. 738-44, Mar 1996.

LONGWORTH, M. S.; LAIMINS, L. A. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 68, n. 2, p. 362-72, Jun 2004.

LORENZATO, F.; HO, L.; TERRY, G. et al. The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). **Int J Gynecol Cancer**, v. 10, n. 2, p. 143-150, Mar 2000.

MANDELL, D. L.; ARJMAND, E. M.; KAY, D. J. et al. Intralesional cidofovir for pediatric recurrent respiratory papillomatosis. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 130, n. 11, p. 1319-23, Nov 2004.

MANJARREZ, M. E.; OCADIZ, R.; VALLE, L. et al. Detection of human papillomavirus and relevant tumor suppressors and oncoproteins in laryngeal tumors. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 23, p. 6946-51, Dec 1 2006.

MAVER, P. J.; KOJAN, B. J.; SEME, K. et al. Prevacination genomic diversity of human papillomavirus genotype 11: a study on 63 clinical isolates and 10 full-length genome sequences. **J Med Virol**, v. 83, n. 3, p. 461-70, Mar 2011.

MCKENNA, M.; BRODSKY, L. Extraesophageal acid reflux and recurrent respiratory papilloma in children. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 69, n. 5, p. 597-605, May 2005.

MCMURRAY, H. R.; NGUYEN, D.; WESTBROOK, T. F. et al. Biology of human papillomaviruses. **Int J Exp Pathol**, v. 82, n. 1, p. 15-33, Feb 2001.

MOSSADEGH, N.; GISSMANN, L.; MULLER, M. et al. Codon optimization of the human papillomavirus 11 (HPV 11) L1 gene leads to increased gene expression and formation of virus-like particles in mammalian epithelial cells. **Virology**, v. 326, n. 1, p. 57-66, Aug 15 2004.

MOUNTS, P.; KASHIMA, H. Association of human papillomavirus subtype and clinical course in respiratory papillomatosis. **Laryngoscope**, v. 94, n. 1, p. 28-33, Jan 1984.

NEBESIO, C. L.; MIROWSKI, G. W.; CHUANG, T. Y. Human papillomavirus: clinical significance and malignant potential. **Int J Dermatol**, v. 40, n. 6, p. 373-9, Jun 2001.

NGHIEM, P.; KUPPER, T. S. Basal and squamous cell carcinomas. **In Principles of molecular medicine**, 1998.

NGUYEN, M. L.; NGUYEN, M. M.; LEE, D. et al. The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo. **J Virol**, v. 77, n. 12, p. 6957-64, Jun 2003.

NINDL, I.; RINDFLEISCH, K.; LOTZ, B. et al. Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer. **Int J Cancer**, v. 82, n. 2, p. 203-7, Jul 19 1999.

NORONHA, V.; MELLO, W.; VILLA, L. et al. [Human papillomavirus associated with uterine cervix lesions]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 32, n. 3, p. 235-40, May-Jun 1999.

OH, S. T.; LONGWORTH, M. S.; LAIMINS, L. A. Roles of the E6 and E7 proteins in the life cycle of low-risk human papillomavirus type 11. **J Virol**, v. 78, n. 5, p. 2620-6, Mar 2004.

ONG, C. K.; CHAN, S. Y.; CAMPO, M. S. et al. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. **J Virol**, v. 67, n. 11, p. 6424-31, Nov 1993.

PARK, J. S.; KIM, E. J.; LEE, J. Y. et al. Functional inactivation of p73, a homolog of p53 tumor suppressor protein, by human papillomavirus E6 proteins. **Int J Cancer**, v. 91, n. 6, p. 822-7, Mar 15 2001.

PASQUALE, K.; WIATRAK, B.; WOOLLEY, A. et al. Microdebrider versus CO2 laser removal of recurrent respiratory papillomas: a prospective analysis. **Laryngoscope**, v. 113, n. 1, p. 139-43, Jan 2003.

PATEL, D.; HUANG, S. M.; BAGLIA, L. A. et al. The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. **EMBO J**, v. 18, n. 18, p. 5061-72, Sep 15 1999.

PAWLITA, M.; GISSMANN, L. [Recurrent respiratory papillomatosis: indication for HPV vaccination?]. **Dtsch Med Wochenschr**, v. 134 Suppl 2, p. S100-2, Apr 2009.

PEREIRA, C. R.; ROSA, M. L.; VASCONCELOS, G. A. et al. Human papillomavirus prevalence and predictors for cervical cancer among high-risk women from Rio de Janeiro, Brazil. **Int J Gynecol Cancer**, v. 17, n. 3, p. 651-60, May-Jun 2007.

PIM, D.; BANKS, L. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. **APMIS**, v. 118, n. 6-7, p. 471-93, Jun 2010.

PIM, D.; THOMAS, M.; BANKS, L. Chimaeric HPV E6 proteins allow dissection of the proteolytic pathways regulating different E6 cellular target proteins. **Oncogene**, v. 21, n. 53, p. 8140-8, Nov 21 2002.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, n. 9, p. 817-8, 1998.

PRANSKY, S. M.; ALBRIGHT, J. T.; MAGIT, A. E. Long-term follow-up of pediatric recurrent respiratory papillomatosis managed with intralesional cidofovir. **Laryngoscope**, v. 113, n. 9, p. 1583-7, Sep 2003.

RANDO, R. F.; GROFF, D. E.; CHIRIKJIAN, J. G. et al. Isolation and characterization of a novel human papillomavirus type 6 DNA from an invasive vulvar carcinoma. **J Virol**, v. 57, n. 1, p. 353-6, Jan 1986.

REEVES, W. C.; RUPARELIA, S. S.; SWANSON, K. I. et al. National registry for juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 129, n. 9, p. 976-82, Sep 2003.

REUTER, S.; DELIUS, H.; KAHN, T. et al. Characterization of a novel human papillomavirus DNA in the cervical carcinoma cell line ME180. **J Virol**, v. 65, n. 10, p. 5564-8, Oct 1991.

RICHARD, C.; LANNER, C.; NARYZHNY, S. N. et al. The immortalizing and transforming ability of two common human papillomavirus 16 E6 variants with different prevalences in cervical cancer. **Oncogene**, v. 29, n. 23, p. 3435-45, Jun 10 2010.

RIHKANEN, H.; AALTONEN, L. M.; SYRJANEN, S. M. Human papillomavirus in laryngeal papillomas and in adjacent normal epithelium. **Clin Otolaryngol Allied Sci**, v. 18, n. 6, p. 470-4, Dec 1993.

ROMANCZUK, H.; HOWLEY, P. M. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 7, p. 3159-63, Apr 1 1992.

ROST, B.; YACHDAV, G.; LIU, J. The PredictProtein server. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. Web Server issue, p. W321-6, Jul 1 2004.

SARKOLA, M. E.; GRENNAN, S. E.; RINTALA, M. A. et al. Human papillomavirus in the placenta and umbilical cord blood. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 87, n. 11, p. 1181-8, 2008.

SCHEFFNER, M.; HUIBREGTSE, J. M.; VIERSTRA, R. D. et al. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. **Cell**, v. 75, n. 3, p. 495-505, Nov 5 1993.

SCHILLER, J. T.; DAY, P. M.; KINES, R. C. Current understanding of the mechanism of HPV infection. **Gynecol Oncol**, v. 118, n. 1 Suppl, p. S12-7, Jun 2010.

SCHRAFF, S.; DERKAY, C. S. Survey of ASPO membership regarding management of RRP distal spread and the use of adjuvant therapies. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2004.

SCHRAFF, S.; DERKAY, C. S.; BURKE, B. et al. American Society of Pediatric Otolaryngology members' experience with recurrent respiratory papillomatosis and the use of adjuvant therapy. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 130, n. 9, p. 1039-42, Sep 2004.

SEDLACEK, T. V.; LINDHEIM, S.; EDER, C. et al. Mechanism for human papillomavirus transmission at birth. **Am J Obstet Gynecol**, v. 161, n. 1, p. 55-9, Jul 1989.

SHANG, Q.; WANG, Y.; FANG, Y. et al. Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 [corrected] genes and long control region in [corrected] cervical carcinomas in patients in northeast China. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 7, p. 2656-63, Jul 2011.

SICHERO, L.; FERREIRA, S.; TROTTIER, H. et al. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. **Int J Cancer**, v. 120, n. 8, p. 1763-8, Apr 15 2007.

SICHERO, L.; SIMAO SOBRINHO, J.; LINA VILLA, L. Oncogenic potential diverge among human papillomavirus type 16 natural variants. **Virology**, v. 432, n. 1, p. 127-32, Oct 10 2012.

SICHERO, L.; VILLA, L. L. Epidemiological and functional implications of molecular variants of human papillomavirus. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, n. 6, p. 707-17, Jun 2006.

SILVERBERG, M. J.; THORSEN, P.; LINDEBERG, H. et al. Condyloma in pregnancy is strongly predictive of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. **Obstet Gynecol**, v. 101, n. 4, p. 645-52, Apr 2003.

SKJELDESTAD, F. E.; MEHTA, V.; SINGS, H. L. et al. Seroprevalence and genital DNA prevalence of HPV types 6, 11, 16 and 18 in a cohort of young Norwegian women: study design and cohort characteristics. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 87, n. 1, p. 81-8, 2008.

SMITH, E. M.; PIGNATARI, S. S.; GRAY, S. D. et al. Human papillomavirus infection in papillomas and nondiseased respiratory sites of patients with recurrent respiratory papillomatosis using the polymerase chain reaction. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 119, n. 5, p. 554-7, May 1993.

SONNEX, C.; STRAUSS, S.; GRAY, J. J. Detection of human papillomavirus DNA on the fingers of patients with genital warts. **Sex Transm Infect**, v. 75, n. 5, p. 317-9, Oct 1999.

SPIEGEL, J. H.; ANDRUS, J. G.; STEFANATO, C. M. et al. Histopathologic effects of cidofovir on cartilage. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 133, n. 5, p. 666-71, Nov 2005.

STAMATAKI, S.; NIKOLOPOULOS, T. P.; KORRES, S. et al. Juvenile recurrent respiratory papillomatosis: still a mystery disease with difficult management. **Head Neck**, v. 29, n. 2, p. 155-62, Feb 2007.

STANLEY, M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. **Gynecol Oncol**, v. 117, n. 2 Suppl, p. S5-10, May 2010.

STEINBERG, B. M.; TOPP, W. C.; SCHNEIDER, P. S. et al. Laryngeal papillomavirus infection during clinical remission. **N Engl J Med**, v. 308, n. 21, p. 1261-4, May 26 1983.

STONE, K. M.; KAREM, K. L.; STERNBERG, M. R. et al. Seroprevalence of human papillomavirus type 16 infection in the United States. **J Infect Dis**, v. 186, n. 10, p. 1396-402, Nov 15 2002.

STOPPLER, M. C.; CHING, K.; STOPPLER, H. et al. Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. **J Virol**, v. 70, n. 10, p. 6987-93, Oct 1996.

SUN, L.; ZHANG, G.; LEI, T. et al. Two different HPV-11E6 fusion proteins trap p53 in the cytoplasm and induce apoptosis. **Cancer Biol Ther**, v. 7, n. 12, p. 1909-15, Dec 2008.

SWOFFORD, D. L. **Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods)**. Version 4 Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2002.

TANG, S.; TAO, M.; MCCOY, J. P., JR. et al. The E7 oncoprotein is translated from spliced E6\*I transcripts in high-risk human papillomavirus type 16- or type 18-positive cervical cancer cell lines via translation reinitiation. **J Virol**, v. 80, n. 9, p. 4249-63, May 2006.

TERAI, M.; DESALLE, R.; BURK, R. D. Lack of canonical E6 and E7 open reading frames in bird papillomaviruses: *Fringilla coelebs* papillomavirus and *Psittacus erithacus timneh* papillomavirus. **J Virol**, v. 76, n. 19, p. 10020-3, Oct 2002.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F. et al. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res**, v. 25, n. 24, p. 4876-82, Dec 15 1997.

UVERSKY, V. N.; ROMAN, A.; OLDFIELD, C. J. et al. Protein intrinsic disorder and human papillomaviruses: increased amount of disorder in E6 and E7 oncoproteins from high risk HPVs. **J Proteome Res**, v. 5, n. 8, p. 1829-42, Aug 2006.

VENKATESAN, N. N.; PINE, H. S.; UNDERBRINK, M. P. Recurrent respiratory papillomatosis. **Otolaryngol Clin North Am**, v. 45, n. 3, p. 671-94, viii-ix, Jun 2012.

VILLA, L. L.; COSTA, R. L.; PETTA, C. A. et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. **Lancet Oncol**, v. 6, n. 5, p. 271-8, May 2005.

VILLA, L. L.; SCHLEGEL, R. Differences in transformation activity between HPV-18 and HPV-16 map to the viral LCR-E6-E7 region. **Virology**, v. 181, n. 1, p. 374-7, Mar 1991.

VON KNEBEL DOEBERITZ, M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. **Eur J Cancer**, v. 38, n. 17, p. 2229-42, Nov 2002.



VRTACNIK BOKAL, E.; KOCJAN, B. J.; POLJAK, M. et al. Genomic variants of human papillomavirus genotypes 16, 18, and 33 in women with cervical cancer in Slovenia. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 36, n. 6, p. 1204-13, Dec 2010.

WADA, K.; AOTA, S.; TSUCHIYA, R. et al. Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data. **Nucleic Acids Res**, v. 18 Suppl, p. 2367-411, Apr 25 1990.

WATSON, R. A.; THOMAS, M.; BANKS, L. et al. Activity of the human papillomavirus E6 PDZ-binding motif correlates with an enhanced morphological transformation of immortalized human keratinocytes. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 24, p. 4925-34, Dec 15 2003.

WELLER, S. C.; STANBERRY, L. R. Estimating the population prevalence of HPV. **JAMA**, v. 297, n. 8, p. 876-8, Feb 28 2007.

WETMORE, R. F.; MUNTZ, H. R.; MCGILL, T. J. **Pediatric Otolaryngology: Principles and Practice Pathways**. 2nd. 2012.

WIATRAC, B. J.; WIATRAC, D. W.; BROKER, T. R. et al. Recurrent respiratory papillomatosis: a longitudinal study comparing severity associated with human papilloma viral types 6 and 11 and other risk factors in a large pediatric population. **Laryngoscope**, v. 114, n. 11 Pt 2 Suppl 104, p. 1-23, Nov 2004.

WUTZLER, P.; THUST, R. Genetic risks of antiviral nucleoside analogues--a survey. **Antiviral Res**, v. 49, n. 2, p. 55-74, Feb 2001.

XI, L. F.; KOUTSKY, L. A.; HILDESHEIM, A. et al. Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 16, n. 1, p. 4-10, Jan 2007.

YAMADA, T.; MANOS, M. M.; PETO, J. et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. **J Virol**, v. 71, n. 3, p. 2463-72, Mar 1997.

YU, T.; FERBER, M. J.; CHEUNG, T. H. et al. The role of viral integration in the development of cervical cancer. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 158, n. 1, p. 27-34, Apr 1 2005.

ZEHBE, I.; WILANDER, E.; DELIUS, H. et al. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. **Cancer Res**, v. 58, n. 4, p. 829-33, Feb 15 1998.

ZEITELS, S. M.; AKST, L. M.; BURNS, J. A. et al. Office-based 532-nm pulsed KTP laser treatment of glottal papillomatosis and dysplasia. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, v. 115, n. 9, p. 679-85, Sep 2006.

ZHAO, K. N.; CHEN, J. Codon usage roles in human papillomavirus. **Rev Med Virol**, v. 21, n. 6, p. 397-411, Nov 2011.

ZHAO, K. N.; LIU, W. J.; FRAZER, I. H. Codon usage bias and A+T content variation in human papillomavirus genomes. **Virus Res**, v. 98, n. 2, p. 95-104, Dec 2003.

ZHOU, J.; LIU, W. J.; PENG, S. W. et al. Papillomavirus capsid protein expression level depends on the match between codon usage and tRNA availability. **J Virol**, v. 73, n. 6, p. 4972-82, Jun 1999.

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