

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 26/08/2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA

Gabriel Vitor da Silva Pinto

**Determinantes do *clearance* da infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) em mulheres em idade reprodutiva: influência de fatores comportamentais, coinfeções sexualmente transmissíveis e resposta imune inata.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Ciências, área – Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva  
Coorientadora: Aline do Nascimento Bolpet

Botucatu  
2019

# Gabriel Vitor da Silva Pinto

Determinantes do *clearance* da infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) em mulheres em idade reprodutiva: influência de fatores comportamentais, coinfeções sexualmente transmissíveis e resposta imune inata.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Ciências, área – Patologia.

Orientadora: Profa.Dra. Márcia Guimarães da Silva  
Coorientadora: Aline do Nascimento Bolpet

Botucatu  
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Pinto, Gabriel Vitor da Silva.

Determinantes do *clearance* da infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) em mulheres em idade reprodutiva : influência de fatores comportamentais, coinfeções sexualmente transmissíveis e resposta imune inata / Gabriel Vitor da Silva Pinto. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Márcia Guimarães da Silva

Coorientador: Aline do Nascimento Bolpet

Capes: 40101150

1. Papillomaviridae. 2. Mulheres. 3. Saúde reprodutiva. 4. Doenças sexualmente transmissíveis. 5. Coinfecção. 6. Resposta imune.

Palavras-chave: Achados ginecológicos; Características comportamentais; *Clearance*; Fatores sociodemográficos; Infecção por HPV.

*Dedicatória*

Dedico aos meus Pais, Silvana e Antônio, meu trabalho, meu empenho e minhas conquistas, pelo apoio incondicional e pela confiança em todas as minhas escolhas, por não medirem esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida. Ao meu avô Tico que foi peça fundamental na formação do meu caráter e sei que onde estiver está muito orgulhoso de mim. A vocês, minha imensa gratidão e sempre amor.

*Agradecimento Especial*

À minha orientadora, Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva, meus mais sinceros agradecimentos pela confiança no meu trabalho desde o meu primeiro dia no laboratório. Muito obrigado por todos os ensinamentos, apoio, incentivo, dedicação e por ter me dado a oportunidade de trabalhar com aquilo que eu gosto.



# *Agradecimientos*

À Deus que se faz presente em todos os momentos da minha vida, pelas conquistas até o momento, mas peço a Ele para me dar sabedoria para conquistar muito mais.

Foram muitas as pessoas que passaram pela minha vida ao longo desses quatro anos e que, de algum modo, tiveram participação nesse trabalho de Doutorado. Portanto, a missão de deixar aqui meus agradecimentos não é uma tarefa tão fácil.

À minha Coorientadora Profa. Dra. Aline do Nascimento Bolpet pela parceria, total apoio e dedicação no desenvolvimento deste trabalho.

Às queridas colegas de Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-Fetal: Amanda Della Coletta, Bruna Ramos, Camila Marconi, Carolina Pereira, Carolina Tafner, Jossimara Polettini, Larissa Marcolino, Laura Martin, Natália Moço e Nathália Noda pela total disponibilidade em fazer este trabalho se tornar possível. A dedicação de todas foi imprescindível. Agradeço pelo trabalho em grupo e a todos os momentos compartilhados.

De um modo especial as amigas conquistadas além laboratório Bruna Ramos, Laura Martin e Natália Moço, pela paciência e apoio incondicional em todos os meus momentos de maior necessidade. Foram fundamentais para a realização deste trabalho a amizade, o carinho e a prontidão de vocês em me ajudar sempre.

À secretária da Pós-Graduação em Patologia, Vânia Soler por sua competência e dedicação.

Ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu e a UNIPEX onde este trabalho foi realizado, pelo apoio imprescindível para a realização e conclusão do meu Doutorado.

Ao Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) da Capes, processo (88881.132503/2016-01), que proporcionou auxílio financeiro para a minha ida à McGill University no Canadá para realizar as análises estatísticas deste projeto.

Ao Department of Oncology and Epidemiology & Biostatistics, McGill University, Montreal, Canada e especialmente ao Dr. Eduardo Franco por me receber em seu grupo de pesquisa e total empenho para analisar os dados desse trabalho, além do treinamento em Epidemiologia que recebi durante meu estágio.

À secretaria de saúde do município de Botucatu, por possibilitar a realização deste trabalho.

Às enfermeiras das Unidades Básicas de Saúde do município de Botucatu que participaram da etapa crucial deste trabalho, por seu empenho em captar mulheres e seu cuidado com as pacientes visando sempre a saúde da mulher.

À CAPES pela bolsa de Doutorado e a FAPESP (Processo: 2012/01278-0) pelo auxílio pesquisa concedido.

Às mulheres que aceitaram participar do estudo, por sua disponibilidade e confiança no projeto.

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação em Patologia, com quem passei bons momentos no decorrer do curso.

Obrigado a todas as pessoas que contribuíram para a realização não só deste trabalho, mas para o meu crescimento como pessoa. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.

*Resumo*

## Resumo

**Objetivo:** O objetivo do presente estudo foi identificar determinantes do *clearance* da infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) em mulheres brasileiras em idade reprodutiva. **Métodos:** Trata-se de estudo de coorte denominado HPV-UNESP, no qual 1638 mulheres em idade reprodutiva foram recrutadas no período de setembro de 2012 e janeiro de 2013. Desse total, 544 mulheres positivas para a infecção pelo HPV participaram do seguimento longitudinal durante 30 meses, em mais 4 visitas. A infecção por HPV foi definida como detecção de qualquer um dos 36 genótipos testados pelo Linear Array Genotyping Test (Roche Molecular Systems, Inc.) e o desfecho de interesse foi o *clearance* da infecção, definido como a eliminação da infecção pelo HPV por, pelo menos, duas visitas consecutivas. Um questionário estruturado com 58 questões relativas à dados sociodemográficos, características comportamentais e ginecológicas foi aplicado em cada visita. Imediatamente após a entrevista, todas as mulheres realizaram exame ginecológico, no qual, após inserção de espéculo de Collins, não lubrificado, foi aferido o pH vaginal com fita (pH 4.0-7.0, Merck, Germany) no terço médio da parede vaginal. Para avaliação da microbiota vaginal, amostras foram coletadas com *swab* da parede vaginal e o padrão de microbiota foi classificado de acordo com os critérios de Nugent et al. (1991). O *whiff test* realizado por adição de solução de 10% de KOH ao conteúdo vaginal foi interpretado como positivo, negativo ou duvidoso. Amostras endocervicais foram coletadas com *cytobrush* para análises moleculares de infecção por HPV, *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*. Amostra adicional com representação de epitélio escamoso e glandular foi coletada para citologia oncológica. Finalmente, uma amostra do fundo de saco da vagina foi coletada com espátula de Ayre para pesquisa de *Trichomonas vaginalis* em meio líquido de Diamond. Em cada visita do seguimento longitudinal amostras vaginais e endocervicais foram recoletadas para realização dos mesmos exames, pelas mesmas técnicas descritas. Modelos de regressão logística foram usados para estimar proporções de riscos (HR), com intervalos de confiança de 95%, de *clearance* de HPV em função de covariáveis no momento da inclusão no estudo ajustadas por idade. **Resultados:** Os *status* civis solteira (HR = 0,67, IC 95% 0,49-0,92) e divorciada (HR = 0,53, IC95% 0.30-0,92) foram associados com atraso no tempo de *clearance* do HPV. O mesmo atraso no tempo de *clearance* foi observado em mulheres que declararam uso de anticoncepcional hormonal (HR = 0,72, IC95% 0,55-0,95) e em mulheres que declararam quatro parceiros sexuais ao longo da vida (HR = 0,55, IC 95% 0,34-0,90). Não houve associação entre concentração de Interleucinas (IL-) 1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 e o Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ) e o tempo de *clearance* do HPV, somente a IL-4 mostrou correlação positiva (HR = 2,40, IC95% 1.11-5.21). Também não houve

associação entre coinfeções endocervicites por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* e de infecção por *Trichomonas vaginalis* com o *clearance* do HPV. **Conclusão:** Apesar da análise de fatores sociodemográficos, características comportamentais e achados ginecológicos, a maioria deles não foi significativamente associado com o *clearance* do HPV.

**Palavras-chave:** Infecção por HPV, *clearance*, fatores sociodemográficos, características comportamentais e achados ginecológicos.

*Abstract*

## Abstract

**Objective:** The objective of the present study was to identify determinants of Human Papillomavirus (HPV) infection clearance in Brazilian women of reproductive age. **Methods:** This is a cohort study called HPV-UNESP, in which 1638 women of reproductive age were recruited from September 2012 to January 2013. Of this total, 544 women positive for HPV infection participated in longitudinal follow-up for 30 months, in 4 more visits. HPV infection was defined as detection of any of the 36 genotypes tested by the Linear Array Genotyping Test (Roche Molecular Systems, Inc.) and the outcome of interest was infection clearance, defined as the elimination of HPV infection by least two consecutive visits. A structured questionnaire with 58 questions regarding sociodemographic data, behavioral and gynecological characteristics was applied at each visit. Immediately after the interview, all women underwent a gynecological exam, in which, after insertion of the non-lubricated Collins speculum, the vaginal pH with tape (pH 4.0-7.0, Merck, Germany) was measured in the middle third of the vaginal wall. For vaginal microbiota evaluation, samples were collected with vaginal wall swab and the microbiota pattern was classified according to the criteria of Nugent et al. (1991). The whiff test performed by adding 10% KOH solution to the vaginal content was interpreted as positive, negative or doubtful. Endocervical samples were collected with cytobrush for molecular analysis of HPV, *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infection. Additional sample with representation of squamous and glandular epithelium was collected for cytology testing. Finally, a sample from the posterior fornix of the vagina was collected with Ayre's spatula for research of *Trichomonas vaginalis* in Diamond liquid medium. At each longitudinal follow-up visit, vaginal and endocervical samples were collected for the same exams, using the same techniques described. Logistic regression models were used to estimate hazard ratios (HR), with 95% confidence intervals, of HPV clearance as a function of covariates at the time of study inclusion adjusted for age. **Results:** Single (HR = 0.67, 95% CI 0.49-0.92) and divorced (HR = 0.53, 95% CI 0.30-0.92) marital status were associated with delayed HPV clearance time. The same delay in clearance time was observed in women who reported hormonal contraceptive use (HR = 0.72, 95% CI 0.55-0.95) and in women who reported four lifetime sexual partners (HR = 0.55, 95% CI 0.34-0.90). There was no association between Interleukin (IL-) 1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 and TNF- $\alpha$  concentration and HPV clearance time, only IL-4 showed positive correlation (HR = 2.40, 95% CI 1.11-5.21). There was also no association between endocervical *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* co-infections and *Trichomonas vaginalis* infection with HPV clearance. **Conclusion:** Despite the



analysis of sociodemographic factors, behavioral characteristics and gynecological findings, most of them were not significantly associated with HPV clearance.

**Keywords:** HPV infection, clearance, sociodemographic factors, behavioral characteristics and gynecological findings.

## Lista de Figuras e Tabelas

### Capítulo I

- Figura 1. Representação esquemática do genoma do Papilomavírus Humano (HPV-16), evidenciando a região regulatória (LCR), as regiões precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e as regiões tardias (L1 e L2). 2
- Figura 2. Árvore filogenética baseada na análise da sequência do gene L1 dos 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. 3
- Figura 3. Estrutura das células epiteliais escamosas e os principais estágios do ciclo de vida do HPV após a infecção. 6

### Capítulo III

- Figura 1. Flowchart of the eligible women for the study and patient’s selection to compose the cohort. 25
- Figure 2. Kaplan-Meier survival estimates of time to clearance of Human Papillomavirus (HPV), age-adjusted hazards ratios (95% confidence intervals) of HPV liberal clearance (defined as clearance of an HPV infection in at least one consecutive visit). 32
- Table 1. Sociodemographic, behavioral and gynecological history characteristics of the participants at enrollment (n=544). 43
- Table 2. Clinical characteristics (n (%)) at baseline and follow-up visits. 45
- Table 3. Age-adjusted hazards ratios (95% confidence intervals) of HPV liberal clearance (defined as clearance of an HPV infection in at least one consecutive visit) as a function of covariates at baseline, n=554. 46
- Table 4. HPV liberal clearance (n=247) as a function of cytokines concentration-adjusted cox regression (N=554). Clearance of an HPV infection in at least one consecutive visit. 54
- Table 5. Univariate associations between subject characteristics and 9 - 15 months period prevalence of High-risk HPV infection as a function of covariates at baseline (n=239). Restricting to women positive for any of the 14 high-risk HPV types, in visits around 9-15 months (clinical follow-up perspective, time to allow for HPV persistence). 56
- Table 6. Univariate associations between cytokines levels and 9 - 15 months period prevalence of High-risk HPV infection as a function of covariates at baseline (n=239). 59
- Figure 1s. Study design detailing the visit moments and all laboratory procedures performed. 60

Table 1S.	HPV prevalence, genotypic distribution of the 36 HPV genotypes found in our population and distribution according to HPV Alpha-papillomavirus subgenus groups at any visit moment.	61
Table 2S.	Concentrations of IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 and TNF- $\alpha$ cytokines, median and range categorized into quartiles.	62

## Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

<b>ALT</b>	<i>Alternative lengthening of telomeres</i> (Alongamento alternativo de telômeros)
<b>ASC-US</b>	<i>Atypical squamous cells of undetermined significance</i> (Células escamosas atípicas de significado indeterminado)
<b>CDK</b>	Quinase dependente de ciclina (Cyclin-dependent kinase)
<b>CI</b>	<i>Confidence interval</i> (Intervalo de confiança)
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>CV</b>	<i>Coefficients of variation</i> (Coeficiente de variância)
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>E1 e E2</b>	Proteína do genoma viral de expressão precoce
<b>E2F</b>	Fator de Transcrição E2F
<b>E6 e E7</b>	Oncoproteínas do genoma viral
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Ensaio de imunoabsorção enzimática)
<b>FMB</b>	Faculdade de Medicina de Botucatu
<b>G1</b>	Fase de interfase
<b>HLA</b>	<i>Human leukocyte antigen</i> (Antígeno leucocitário humano)
<b>HPV</b>	<i>Human Papillomavirus</i> (Papilomavírus Humano)
<b>HR</b>	<i>Hazards ratios</i>
<b>HSIL</b>	<i>High grade squamous intraepithelial lesion</i> (Lesão Intraepitelial escamosa de alto grau)
<b>HSPG</b>	<i>Heparan sulfate proteoglycans</i> (Proteoglicanos de sulfato de heparano)
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferon $\gamma$
<b>IL</b>	Interleucina
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>IST</b>	Infecção sexualmente transmissível
<b>KOH</b>	Hidróxido de potássio
<b>L1 e L2</b>	Proteínas do capsídeo viral de expressão tardia
<b>LCR</b>	<i>Long control region</i> (Região longa de controle)
<b>LSIL</b>	<i>Low-grade squamous intraepithelial lesion</i> (Lesão Intraepitelial escamosa de baixo grau)

<b>mL</b>	Mililitro
<b>NILM</b>	<i>Negative for intraepithelial lesion and malignancy</i> (Negativo para lesão intra-epitelial ou malignidade)
<b>OR</b>	<i>Odds ratio</i>
<b>p21</b>	Proteína de 21 kDa
<b>p27</b>	Proteína de 27 kDa
<b>p53</b>	Fosfoproteína com peso molecular de 53kDa
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
<b>pg</b>	Picograma
<b>pRb</b>	Proteína Retinoblastoma
<b>PSD95/Dlg/ZO-1 e PDZ</b>	Domínio protéico PSD95/Dlg/ZO-1 e PDZ
<b>PTPN13</b>	Proteína tirosina fosfatase codificada pelo gene não receptor 13
<b>S</b>	Fase de síntese do ciclo celular
<b>TERT</b>	<i>Telomerase reverse transcriptase</i> (Trascriptase reversa da telomerase)
<b>Th1</b>	<i>T helper cells</i> (linfócitos T auxiliares)
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<i>Tumour necrosis factor <math>\alpha</math></i> (Fator de necrose tumoral $\alpha$ )
<b>UNESP</b>	Universidade Estadual Paulista
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VLP</b>	<i>Virus-like particles</i> (Partículas semelhantes aos vírus)

# *Sumário*

## Sumário

### Capítulo I – Revisão da Literatura

<b>1.</b>	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
1.1.	Papilomavírus Humano (HPV)	1
1.1.1.	Biologia do vírus	2
1.2.	Infecção viral	5
1.2.1.	Fatores associados à infecção por HPV	7
1.2.2.	Eliminação viral	8
<b>2.</b>	<b>Referências bibliográficas</b>	<b>10</b>

### Capítulo II - Objetivos

<b>1.</b>	<b>Objetivos</b>	<b>18</b>
1.1.	Objetivo geral	18
1.2.	Objetivos específicos	18

### Capítulo III - Article: Determinants of human papillomavirus clearance among Brazilian women of reproductive age: the influence of behavior, sexually transmitted coinfection and innate immune response.

<b>1.</b>	<b>Abstract</b>	<b>20</b>
<b>2.</b>	<b>Introduction</b>	<b>22</b>
<b>3.</b>	<b>Patients and Methods</b>	<b>24</b>
3.1.	Cohort description	24
3.2.	Face-to-face interview and specimen collection	26
3.3.	HPV testing	26
3.4.	<i>Chlamydia trachomatis</i> and <i>Neisseria gonorrhoeae</i> testing	27
3.5.	<i>Trichomonas vaginalis</i> testing	28
3.6.	Vaginal microbiota pattern	28
3.7.	Cytology testing	29
3.8.	Cervical cytokine analyses	29
3.9.	Statistical Analyses	29

3.9.1	Definitions	30
3.10.	Role of the funding source	31
<b>4.</b>	<b>Results</b>	31
4.1.	Characteristics of the cohort	31
4.2.	HPV and <i>Chlamydia trachomatis</i> prevalence	33
4.3.	Cervical cytokine profile	34
4.4.	Clinical follow-up perspective for HR-HPV persistence	35
<b>5.</b>	<b>Discussion</b>	36
<b>6.</b>	<b>References</b>	39
	<b>Anexos</b>	63



## *Capítulo I – Revisão de literatura*

## **1. Introdução**

### **1.1. Papilomavírus Humano**

O Papilomavírus Humano (HPV) é responsável por uma das infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) virais mais comuns no mundo e que se encontra presente em grande parcela da população, sendo a maior parte das mulheres infectadas logo após o início da atividade sexual<sup>1,2</sup>. Estabelecido como causa necessária para o câncer cervical, tendo a infecção persistente com os genótipos HPV16 e HPV18 responsáveis por causar 70% de lesões invasivas e 50% de lesões cervicais pré-invasivas em todo o mundo<sup>3</sup>, estima-se também que contribua para 88% dos cânceres anais e mais de 50% dos cânceres da vulva, vagina e pênis<sup>4</sup>. Os HPVs também são causa importante para o desenvolvimento do câncer de orofaringe e das verrugas anogenitais<sup>5,6</sup>.

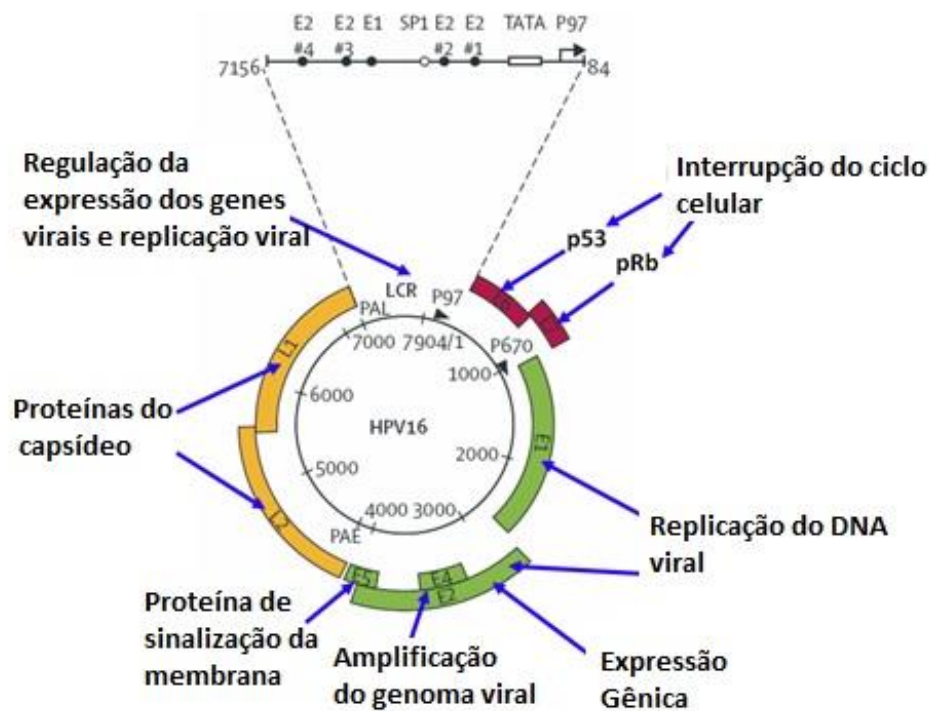
Estima-se que a maioria das pessoas será infectada, por algum genótipo de HPV, em algum momento da sua vida<sup>7</sup>. No entanto, a maioria das pessoas elimina essas infecções espontaneamente, mesmo quando não são vacinadas, no período de seis meses a 1 ano<sup>8,9</sup>. Apenas uma minoria das pessoas permanece com a infecção de forma persistente e pode, eventualmente, resultar em lesões benignas ou malignas<sup>10</sup>. Enquanto a estimativa global de prevalência de HPV é reportada como sendo de 11,7%, as prevalências específicas variam de 1,6% a 41,9%<sup>11</sup>. Essa variação depende da população, região e país, sendo a prevalência de HPV maior em regiões em desenvolvimento (14,3%) do que em regiões desenvolvidas (10,3%). A distribuição da infecção HPV tipo-específica também varia nas regiões geográficas e alguns tipos específicos são mais prevalentes na região Ásia Pacífico do que em outras regiões do mundo<sup>12</sup>.

O câncer cervical é a quarta causa mais comum de neoplasia do mundo, com uma incidência mundial estimada de 528.000 casos e 266.000 mortes em 2012<sup>13</sup>. Especificamente no Brasil, a doença, na região sudeste, é a quarta mais prevalente, com 16 casos para cada 100.000 mulheres e na região norte o câncer do colo do útero é a principal causa de câncer em mulheres<sup>14</sup>.

### 1.1.1. Biologia do vírus

O HPV pertence à família *Papillomaviridae* e é um vírus de DNA circular de fita dupla, não envelopado, com aproximadamente 8000 pares de base que infecta células dos tecidos epitelial e mucoso<sup>15, 16</sup>.

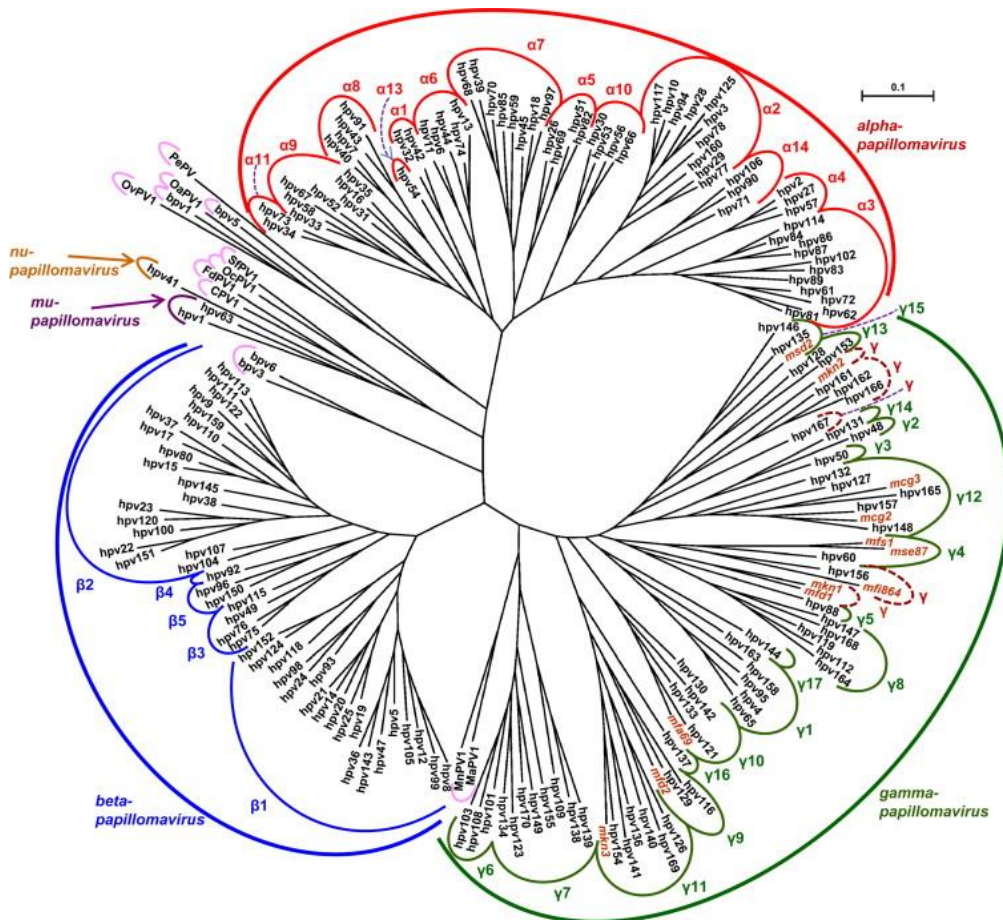
A organização genômica do vírus é bem conservada e o genoma viral está dividido em 3 regiões: a região regulatória (LCR, *long control region*), região precoce (*Early*) e região tardia (*Late*). A região LCR contém a origem de replicação do DNA, responsável pela regulação da expressão gênica. Os genes L1 e L2, localizados na região tardia, codificam as proteínas do capsídeo viral (Figura 1)<sup>17</sup>. Os genes da região precoce, E1 e E2, codificam proteínas envolvidas na replicação do DNA viral e no controle da transcrição. Os genes E6 e E7 codificam proteínas com atividade de transformação e imortalização celular<sup>18</sup>.



**Figura 1:** Representação esquemática do genoma do Papilomavírus Humano (HPV-16), evidenciando a região regulatória (LCR), as regiões precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e as regiões tardias (L1 e L2). Adaptado de Schiffman et al. (2007).

Atualmente na literatura são descritos mais de 200 tipos de HPV, que são diferenciados em 5 grupos de acordo com seu tropismo epitelial e doenças associadas<sup>19,20</sup>. Os HPVs associados às infecções nas mucosas pertencem à família dos Alfa Papilomavírus, que apresentam tropismo por células do epitélio genital, e são classificados quanto ao seu

potencial oncogênico, baseado na espécie de origem e no grau de relação dos genomas virais mediante a comparação da sequência de nucleotídeos do seu genoma viral<sup>21</sup>. O gênero Alphapapilomavírus 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 (Figura 2)<sup>21</sup>. Os membros da família *Papillomaviridae* são comuns na natureza e já foram isolados e caracterizados de répteis<sup>22</sup>, aves<sup>23</sup>, marsupiais<sup>24</sup> e diversas espécies de mamíferos<sup>25</sup>.



**Figura 2.** Árvore filogenética baseada na análise da sequência do gene L1 dos 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: de Villiers (2013).

Os HPVs de baixo risco oncogênico estão associados ao desenvolvimento de verrugas genitais, enquanto os tipos de alto risco estão relacionados às lesões precursoras e ao câncer de colo do útero<sup>26</sup>. Os genótipos de HPVs de alto risco oncogênico mais comumente encontrados nas infecções anogenitais são: HPV-16, 18, 31, 33 e 45, sendo os HPVs 16 e 18

juntos são responsáveis por mais de 70% dos casos de carcinomas epidermóides e mais de 80% dos adenocarcinomas do colo do útero<sup>21, 27</sup>. Estima-se que em regiões menos desenvolvidas cerca de 17,8% das mulheres com citologia normal apresentem infecção latente pelo HPV<sup>28</sup>.

O potencial oncogênico do HPV está relacionado principalmente à capacidade de expressar os oncogenes E6 e E7 que resultam na inativação das proteínas p53 e pRb, respectivamente, interferindo no ciclo celular e nos genes supressores de tumor<sup>29</sup>. A E6 medeia a degradação não somente de p53, mas também de proteínas que contém os domínios PSD95/Dlg/ZO-1 e PDZ que modulam as vias de sinalização celular que regulam a diferenciação celular, como por exemplo, o gene *PTPN13*, que pertence a uma família de moléculas sinalizadoras que regulam uma variedade de processos celulares incluindo crescimento celular, diferenciação do ciclo celular e transformação oncogênica<sup>30-32</sup>. A proteína E7 interage com membros da família Rb através de um *motif* conservado LXCXE que está presente na região amino-terminal dessas proteínas. A família Rb controla a transição da fase G1-S pela regulação da atividade de fatores de transcrição da família E2F<sup>33</sup>. Sítios de ligação para E2F são encontrados em muitos genes que estão envolvidos na regulação da progressão do ciclo celular, diferenciação, mitose e apoptose<sup>34</sup>. Em células normais, pRb reprime a transcrição de promotores dependentes de E2F por meio da ligação direta com o domínio de transativação de E2F<sup>35</sup>. A ligação de E7 de HPVs de alto risco à pRb perturba o complexo RB-E2F<sup>36</sup> resultando na expressão constitutiva dos genes que respondem a E2F, como ciclina A e ciclina E, e promove a entrada prematura na fase S e a síntese de DNA<sup>37,38</sup>. A proteína também leva as proteínas da família RB a degradação proteossomal por meio de vias dependente de ubiquitina<sup>39, 40</sup>. Em adição à desestabilização de RB, E7 contribui para a imortalização por meio da interação com proteínas chaves que controlam a progressão do ciclo celular. Os inibidores de CDK, p21 e p27, são importantes reguladores do controle do crescimento celular durante a diferenciação epitelial, e p21 é conhecido como um supressor tumoral na carcinogênese cervical<sup>41</sup>. A região carboxi-terminal da proteína E7 tem a capacidade de se ligar a p21 e p27 e inibir sua ação no controle do ciclo celular<sup>42, 43</sup>.

Adicionalmente as proteínas E6 e E7 de HPVs de alto risco podem contribuir para a imortalização das células infectadas por meio da ativação da telomerase. E6 de HPVs de alto risco podem ativar a transcrição da transcricatase reversa da telomerase (TERT), que em conjunto com a inativação de RB pela E7 é um passo essencial para a imortalização celular<sup>44, 45</sup>. Alguns estudos sugerem que E7 atua promovendo o alongamento dos telômeros por meio da

via alternativa de alongamento de telômeros (*Alternative lengthening of telomeres –ALT*), que envolve recombinação homóloga entre os telômeros de cromátides irmãs<sup>46, 47</sup>. Acredita-se que a ativação de ALT pela E7 seja importante na manutenção do comprimento dos telômeros nos estágios iniciais do desenvolvimento do câncer<sup>35</sup>.

## **1.2. Infecção Viral**

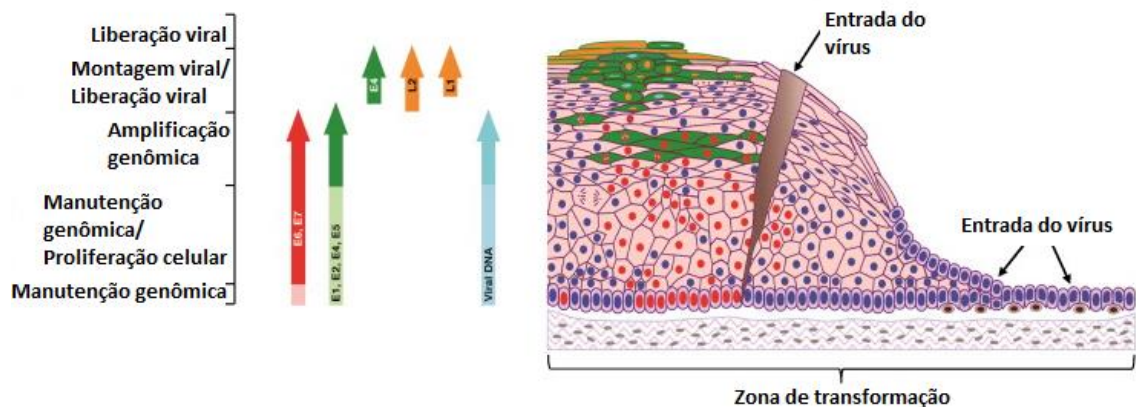
O HPV apresenta tropismo por células epiteliais, causando infecções no tecido de revestimento, tais como a pele e mucosas. Os HPVs infectam células-tronco basais ou células transitórias amplificadoras do tecido epitelial da junção escamoso colunar do colo do útero<sup>48, 49</sup>. O vírus faz a sua entrada nas células epiteliais basais através micro abrasões ou lesões de continuidade epitelial. O seu ciclo de vida, que está diretamente relacionado ao processo de diferenciação da célula hospedeira, inicia-se com a infecção de células epiteliais basais que provavelmente foram expostas à microtraumas, lesões ou abrasões na epiderme (Figura 3)<sup>19</sup>. Nas células basais, o genoma viral é mantido em baixo número de cópias<sup>50</sup>. Somente após a diferenciação em células parabasais, ocorre a amplificação do genoma viral. A montagem do vírus e a eliminação das partículas virais para o meio extracelular ocorre nas camadas cornificadas ou mais superficiais do tecido epitelial<sup>51</sup>.

O mecanismo molecular que facilita a transmissão do HPV é pouco estudado. No entanto, é claro que envolve os capsídeos sem envelope, que são construídos por L1 e L2, as principais e menores proteínas da cápside viral, respectivamente. A proteína tardia L1 se autoestrutura em um capsídeo com formato icosaédrico, que consiste em 72 pentâmeros, também chamados de capsômeros<sup>52</sup>. A proteína L2 menor do capsídeo auxilia na formação do capsídeo do genoma, que por sua vez é cromatinizada pelas histonas celulares<sup>53</sup>. A presença do DNA viral compacta e estabiliza ainda mais o capsídeo<sup>54</sup>.

Os proteoglicanos de sulfato de heparano (HSPG) encontrados na superfície da célula hospedeira, voltados para a matriz extracelular, atuam como receptores iniciais para as *virus-like particles* (VLPs) do vírus<sup>55</sup>. A ligação inicial do HSPG a porções de L1 facilita as mudanças conformacionais em L2<sup>56</sup>. Subsequentemente, a proteína L2 é clivada por furina na superfície da célula em um local de clivagem de consenso que se conserva entre todos os papilomavírus<sup>57</sup>. A entrada de vírus em uma célula hospedeira é muito lento (até 12 h), possivelmente devido a mudanças conformacionais no capsídeo e nos receptores<sup>58</sup>. Após uma ligação bem-sucedida ao receptor, o vírus é internalizado na célula por endocitose<sup>59</sup>. O

genoma viral entra no núcleo através de quebra de envelope nuclear. Em seguida, ele localiza receptores nucleares<sup>60</sup>. Uma vez inserido no núcleo, o HPV replica um baixo número de cópias (10-200 número de cópias/célula) durante a amplificação inicial e estabelecimento de infecção<sup>61</sup>.

O vírus se utiliza da alta capacidade das células epiteliais de se reproduzirem para a replicação de seu DNA viral, e, dependem da expressão dos genes precoces E1 e E2 que estimulam o ciclo celular que neste momento tem o aumento dos seus níveis<sup>62</sup>. Nas camadas mais diferenciadas do epitélio, proteínas do capsídeo são expressas para a produção de novos capsídeos, montagem das partículas virais e liberação da progênie<sup>63</sup>. O HPV é capaz de evadir-se do sistema imunológico do hospedeiro através de inúmeros mecanismos, dentre eles, está o de não indução de citólise e de necrose. Outro mecanismo de evasão consiste no fato de proteínas virais imunogênicas serem liberadas apenas por células epiteliais das camadas mais diferenciadas, portanto menos acessíveis pela vigilância imunológica<sup>64</sup>.



**Figura 3:** Estrutura das células epiteliais escamosas e os principais estágios do ciclo de vida do HPV após a infecção. Adaptado de Doorbar et al. (2012).

Embora a integração do vírus ao DNA da célula hospedeira não faça parte do ciclo de vida normal do HPV, os genótipos de alto risco oncogênico são frequentemente integrados no genoma humano em tecido de carcinoma cervical<sup>65</sup>. Foi proposto que a mudança da forma episomal para a integração do HPV ao genoma da célula pode ser o evento inicial associado à progressão da lesão intra-epitelial de baixo grau para a lesão intra-epitelial de alto grau, portanto, espera-se que seja um biomarcador para a progressão do câncer<sup>66</sup>.

### **1.2.1. Fatores associados à infecção por HPV**

A transmissão do HPV se dá por contato direto, pele a pele, portanto a penetração sexual é a forma mais comum de transmissão do vírus<sup>67</sup>. Sendo assim, os comportamentos sexuais são determinantes para o aumento do risco da infecção. Os fatores associados à infecção pelo HPV podem ser divididos em três grupos: (1) Ambientais ou fatores exógenos, que incluem dietas deficientes, uso de contraceptivo hormonal, múltipla paridade, múltiplos parceiros sexuais, iniciação sexual precoce, consumo de álcool e tabaco, e coinfeção por outros agentes sexualmente transmissíveis; (2) Aspectos inerentes ao vírus, tais como, infecção por HPV de alto ou baixo risco oncogênico, infecções por múltiplos genótipos virais, infecções por variantes de HPV de alto risco que diferem quanto ao potencial oncogênico, carga viral e integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira; (3) Fatores inerentes ao hospedeiro, como os hormônios endógenos, fatores genéticos (polimorfismos de HLA) e fatores relacionados à resposta imunológica<sup>68-70</sup>.

Com relação ao uso de preservativos como fator associado à infecção pelo HPV, existem ainda alguns paradoxos na literatura<sup>71-75</sup>. O uso de preservativos masculinos, mostrou efeito protetor considerável, quando usado corretamente e de forma consistente, em relação a aquisição de infecções sexualmente transmissíveis, incluindo: tricomoníase, cervicite clamidiana, gonorreia e HIV. Os dados sobre efeito protetor em relação às infecções de HPV e às lesões cervicais relacionadas têm sido menos consistentes. Em revisão sistemática, Manhart & Koutsky<sup>76</sup> identificaram 20 estudos relevantes e os resultados não são homogêneos. A inconsistência a respeito do efeito protetor sugere que os preservativos não constituem método altamente eficaz em prevenir as infecções por HPV. De forma geral, homens e mulheres optam por usar preservativos com parceiros que eles consideram ser de maior risco, como novos parceiros, parceiros casuais e profissionais do sexo. Por outro lado, não o utilizam com parceiros que consideram ser seguros, como os parceiros regulares e os cônjuges. As normas culturais desempenham papel importante na forma como as informações confidenciais são divulgadas para os pesquisadores. Como o uso de preservativos é socialmente desejável, pode ser relatado mais frequentemente do que representado pela realidade, o que torna os dados a cerca do uso de preservativos de difícil interpretação<sup>77,78</sup>.

Com relação ao uso de contraceptivo oral, estudos relatam que a prevalência de HPV em mulheres que o utilizam é maior quando comparada com a prevalência em mulheres que nunca usaram contraceptivo<sup>79, 80</sup>. Segundo Lee et al.<sup>81</sup> os níveis hormonais afetam



sobremaneira a composição do microbioma vaginal, sugerindo que o uso de contraceptivo oral possa ser considerado um risco independente para infecção por HPV devido a sua habilidade de alterar o microbioma vaginal.

A infecção concomitante por outros agentes sexualmente transmissíveis ou pelo *core* patológico da microbiota vaginal alterada, tem sido associadas com processos inflamatórios do colo do útero, situação que pode facilitar à aquisição de HPV<sup>11, 82-84</sup>. Lesões herpéticas ulcerativas podem agir como cofatores do HPV, facilitando o acesso do vírus para a camada de células basais. Respostas inflamatórias induzidas por infecções herpéticas podem interferir na capacidade do hospedeiro de montar resposta imune eficaz para a infecção por HPV, suprimindo linfócitos T auxiliares e alterando o estabelecimento de uma resposta imune celular mediada por linfócitos T<sup>85</sup>.

A estimativa global da prevalência da infecção por *Neisseria gonorrhoeae* é de 0,8% (0,6–1,0%)<sup>86</sup>. Esta infecção sexualmente transmissível vem demonstrado uma consistente evidência de associação com a infecção pelo HPV, achados de um aumentado risco para  $\geq$ ASC-US e principalmente HSIL em mulheres com coinfeção por HPV e *N. gonorrhoeae*, sugerindo uma possível ação sinérgica na progressão de lesões cervicais<sup>87</sup>.

Outro agente sexualmente transmissível que tem sido associado à infecção por HPV é a infecção por *Chlamydia trachomatis*. O processo inflamatório, e consequente dano oxidativo decorrente da inflamação clamidiana, pode facilitar a infecção pelo HPV, e sua persistência pode estar associada ao desenvolvimento de lesão cervical<sup>88</sup>. Alguns estudos têm apontado a infecção por *C. trachomatis* como importante cofator associado ao desenvolvimento de neoplasias do colo uterino<sup>89, 90</sup>, embora ainda existam controvérsias<sup>91, 92</sup>. Os estudos que descrevem associação entre presença de infecção por *C. trachomatis* e aumento do risco do desenvolvimento de doença induzida pelo HPV, sugerem que este patógeno é capaz de promover um cenário pró-inflamatório, levando a produção de grandes quantidades locais de citocinas pró-inflamatórias, produzindo um ambiente inflamatório crônico que pode contribuir possivelmente para a persistência do DNA do HPV no colo do útero<sup>93</sup>. O mecanismo biológico pelo qual a *C. trachomatis* atua a fim de facilitar a aquisição do HPV ainda é uma difícil questão a ser avaliada. Uma vez que ambos os agentes microbianos estão fortemente relacionados com a atividade sexual, dificultando a avaliação de um efeito independente da infecção por *C. trachomatis* sobre o risco de infecção por HPV<sup>11</sup>.

### **1.2.2. Eliminação viral**

Em cerca de 80% das mulheres infectadas pelo HPV, a eliminação viral ocorre antes da integração viral no genoma do hospedeiro, o estágio responsável pela carcinogênese<sup>94</sup>. Infecção por HPV persistente com risco elevado de câncer cervical ocorre em apenas uma pequena porcentagem de mulheres infectadas pelo vírus<sup>95</sup>. Embora a probabilidade e o tempo do *clearance* viral possam variar com base em fatores como idade das mulheres, tipo de HPV, comportamento sexual e *status* de tratamento no início, existem evidências de que a maioria das mulheres infectadas pelo HPV tende a eliminar o vírus dentro de 12 a 24 meses após a primeira detecção<sup>96</sup>. Estudos de coorte demonstram que a depuração viral varia entre 55% e 64% aos 6 meses e entre 67% e 80% aos 12 meses<sup>97-100</sup>.

A importância da eliminação/persistência do HPV foi reconhecida recentemente, e o número de estudos abordando essas questões aumentou substancialmente nos últimos anos. No entanto, os dados ainda são incompletos e, em parte, inconsistentes quanto aos cofatores que podem participar na regulação destes eventos<sup>101,102</sup>.

O mecanismo envolvido na persistência viral é complexo e ainda não totalmente compreendido. Portanto, é fundamental identificar, entre uma coorte de mulheres infectadas pelo HPV, aquelas que não eliminam a infecção em um determinado momento. Além disso, a história natural de depuração de uma infecção por HPV cervicovaginal precisa ser melhor compreendida para prever seus possíveis resultados.

## **2. Referências bibliográficas**

1. Giuliano AR, Nyitray AG, Kreimer AR, et al. EUROGIN 2014 roadmap: differences in human papillomavirus infection natural history, transmission and human papillomavirus-related cancer incidence by gender and anatomic site of infection. *Int J Cancer*. 2015;136(12):2752-2760.
2. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol*. 2015;25 Suppl 1:20-23.
3. Hariri S, Bennett NM, Niccolai LM, et al. Reduction in HPV 16/18-associated high grade cervical lesions following HPV vaccine introduction in the United States - 2008-2012. *Vaccine*. 2015;33(13):1608-1613.
4. Plummer M, de Martel C, Vignat J, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Health*. 2016;4(9):e609-e616.
5. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Biological agents volume 100 B A review of human carcinogens. Lyon, France – 2012.
6. Lurie S, Mizrahi Y, Chodick G, et al. Impact of quadrivalent human papillomavirus vaccine on genital warts in an opportunistic vaccination structure. *Gynecol Oncol*. 2017;146(2):299-304.
7. Baudu A, Prétet JL, Riethmuller D, et al. Prevalence and risk factors of human papillomavirus infection types 16/18/45 in a cohort of French females aged 15-23years. *J Epidemiol Glob Health* 2014; 4:35-43.
8. Rositch AF, Koshiol J, Hudgens MG, et al. Patterns of persistent genital human papillomavirus infection among women worldwide: a literature review and meta-analysis. *Int J Cancer* 2013; 133(6): 1271–1285.
9. Cho HW, So KA, Lee JK, et al. Type-specific persistence or regression of human papillomavirus genotypes in women with cervical intraepithelial neoplasia 1: a prospective cohort study. *Obstet Gynecol Sci* 2015; 58(1): 40–45.
10. Goodman A. HPV testing as a screen for cervical cancer. *BMJ*. 2015 30;350:h2372.
11. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, et al. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infection Dis* 2010; 202:1789-1799.

12. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet* 2005; 366:991-998.
13. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer.* 2015;136:E359–E386.
14. INCA. Instituto Nacional do Câncer [Internet]. Ministério da Saúde. [cited 2019 Jul 26]. Available at <http://www.inca.gov.br> 2019.
15. Sarchianaki E, Derdas SP, Ntaoukakis M, et al. Detection and genotype analysis of human papillomavirus in non-small cell lung cancer patients. *Tumour Biol.*2014;35:3203-3209.
16. Storey R, Joh J, Kwon A, et al. Detection of Immunoglobulin G against E7 of Human Papillomavirus in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Oncol* 2013; 240164.
17. Schiffman M, Castle PM, Jeronimo J, et al. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2007;370(9590):890-907.
18. Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 2002; 89:213-228.
19. Doorbar J, Quint W, Banks L, et al. The biology and life-cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine* 2012; 30:F55–F70.
20. Sohrabi A, Hajia M, Jamali F, et al. Is incidence of multiple HPV genotypes rising in genital infections? *J Infect Public Health.* 2017;10(6):730-733.
21. de Villiers EM . Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology.* 2013;445(1-2):2-10.
22. Herbst LH, Lenz J, Van Doorslaer K, et al. Genomic characterization of two novel reptilian papillomaviruses, *Chelonia mydas* papillomavirus 1 and *Caretta caretta* papillomavirus 1. *Virology.* 2009;383(1):131-135.
23. Terai M, DeSalle R, Burk RD. Lack of canonical E6 and E7 open reading frames in bird papillomaviruses: *Fringilla coelebs* papillomavirus and *Psittacus erithacus timneh* papillomavirus. *J Virol.* 2002;76(19):10020-10023.
24. Bennett MD, Reiss A, Stevens H, et al. The first complete papillomavirus genome characterized from a marsupial host: a novel isolate from *Bettongia penicillata*. *J Virol.* 2010 ;84(10):5448-5453.
25. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology.* 2010;401(1):70-79.
26. Burd EM, Dean CL. Human Papillomavirus. *Microbiol Spectr.* 2016;4(4).

27. de Oliveira CM, Fregnani JH, Carvalho JP, et al. Human papillomavirus genotypes distribution in 175 invasive cervical cancer cases from Brazil. *BMC Cancer*. 2013;13:357.
28. Alizon S, Murall CL, Bravo IG. Why Human Papillomavirus Acute Infections Matter. *Viruses*. 2017;9(10).
29. Liu S, Minaguchi T, Lachkar B, et al. Separate analysis of human papillomavirus E6 and E7 messenger RNAs to predict cervical neoplasia progression. *PLoS One*. 2018;13(2):e0193061.
30. Thatte J, Massimi P, Thomas M, et al. The Human Papillomavirus E6 PDZ Binding Motif Links DNA Damage Response Signaling to E6 Inhibition of p53 Transcriptional Activity. *J Virol*. 2018;92(16).
31. Mittal S, Banks L. Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2017;772:23-35.
32. Spanos WC, Hoover A, Harris, GF, et al. The PDZ binding motif of human papillomavirus type 16 E6 induces PTPN13 loss, which allows anchorage-independent growth and synergizes with ras for invasive growth. *J Virol*. 2008;82(5):2493-2500.
33. Thwaites MJ, Cecchini MJ, Passos DT, et al. Interchangeable Roles for E2F Transcriptional Repression by the Retinoblastoma Protein and p27KIP1-Cyclin-Dependent Kinase Regulation in Cell Cycle Control and Tumor Suppression. *Mol Cell Biol*. 2017;37(2).
34. Benevolenskaya EV, Frolov MV. Emerging links between E2F control and mitochondrial function. *Cancer Res*. 2015;75(4):619-623.
35. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(8):550-560.
36. Chellappan S, Kraus VB, Kroger B. et al. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(10):4549-4553
37. Carrillo D, Muñoz JP, Huerta H, et al. Upregulation of PIR gene expression induced by human papillomavirus E6 and E7 in epithelial oral and cervical cells. *Open Biol*. 2017;7(11).
38. Zerfass K, Schulze A, Spitzkovsky D. et al. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J Virol*. 1995;69(10):6389-6399.
39. Boyer SN, Wazer DE, Band V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res*. 1996;56(20):4620-4624.

40. Jones DL, Thompson DA, MUNGER K. Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to HPV type 16 E7-induced apoptosis. *Virology*. 1997;239(1):97-107.
41. Shin MK, Balsits S, Brake T. et al. Human papillomavirus E7 oncoprotein overrides the tumor suppressor activity of p21Cip1 in cervical carcinogenesis. *Cancer Res*. 2009;69(14):5656-5663.
42. Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B. et al. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene*. 1996;13(11):2323-2330.
43. Jones DL, Alani RM, Munger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev*. 1997;11(16):2101-2111.
44. Hoppe-Seyler K, Bossler F, Braun JA, et al. The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. *Trends Microbiol*. 2018;26(2):158-168.
45. Vande Pol SB, Klingelutz AJ. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*. 2013;445(1-2):115-137.
46. Pańczyszyn A, Boniewska-Bernacka E, Głąb G. Telomeres and Telomerase During Human Papillomavirus-Induced Carcinogenesis. *Mol Diagn Ther*. 2018;22(4):421-430.
47. Spardy N, Duensing A, Hoskins EE. et al. HPV-16 E7 reveals a link between DNA replication stress, fanconi anemia D2 protein, and alternative lengthening of telomereassociated promyelocytic leukemia bodies. *Cancer Res*. 2008;68(23):9954-9963.
48. Aksoy P, Gottschalk EY, Meneses PI. HPV entry into cells. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2017;772:13-22.
49. Schmitt A, Rochat A, Zeltner R, et al. The primary target cells of the high-risk cottontail rabbit papillomavirus colocalize with hair follicle stem cells. *J Virol*. 1996;70(3):1912-1922.
50. McBride AA. Mechanisms and strategies of papillomavirus replication. *Biol Chem*. 2017 Jul 26;398(8):919-927.
51. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004;68(2):362-372.
52. Becker M, Greune L, Schmidt MA, et al. Extracellular Conformational Changes in the Capsid of Human Papillomaviruses Contribute to Asynchronous Uptake into Host Cells. *J Virol*. 2018;92(11). pii: e02106-e2117.
53. Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, et al. Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J Virol*. 2004;78(2):751-757.

54. Fligge C, Schafer F, Selinka HC, et al. DNA-induced structural changes in the papillomavirus capsid. *J Virol*. 2001;75(16):7727-7731.
55. Richards KF, Bienkowska-Haba M, Dasgupta J, et al. Multiple heparan sulfate binding site engagements are required for the infectious entry of human papillomavirus type 16. *J Virol*. 2013;87(21):11426-11437.
56. Bienkowska-Haba M, Patel HD, Sapp M. Target cell cyclophilins facilitate human papillomavirus type 16 infection. *PLoS Pathog*. 2009;5(7):e1000524.
57. Richards RM, Lowy DR, Schiller JT, et al. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(5):1522-1527.
58. Havre PA, Yuan J, Hedrick L, et al. p53 inactivation by HPV16 E6 results in increased mutagenesis in human cells. *Cancer Res*. 1995;55(19):4420-4424.
59. Schelhaas M, Shah B, Holzer M, et al. Entry of human papillomavirus type 16 by actin-dependent, clathrin- and lipid raft-independent endocytosis. *PLoS Pathog*. 2012;8(4):e1002657.
60. Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, et al. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog*. 2009;5(2):e1000318.
61. De Geest K, Turyk ME, Hosken MI, et al. Growth and differentiation of human papillomavirus type 31b positive human cervical cell lines. *Gynecol Oncol*. 1993;49(3):303-310.
62. MCMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, et al. Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Pathol*. 2001;82(1):15-33.
63. Hebner CM, Laimins LA. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol*. 2006;16(2):83-97.
64. Veldhuijzen NJ, Snijders PJF, Reiss P, et al. Factors affecting transmission of mucosal human papillomavirus. *Lancet Infect Dis* 2010;10: 862–874.
65. Duensing S, Münger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer* 2004;109:157-162.
66. Williams VM, Filippova M, Soto U, et al. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virol*. 2011; 6(1): 45–57.
67. Münger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*. 2002;89:213-228.
68. Lee H, Lee DH, Song YM, et al. Risk factors associated with human papillomavirus infection status in a Korean cohort. *Epidemiol Infect*. 2014;142: 1579-1589.

69. Figueiredo Alves RR, Turchi MD, Santos LE, et al. Prevalence, genotype profile and risk factors for multiple human papillomavirus cervical infection in unimmunized female adolescents in Goiânia, Brazil: a community-based study. *BMC Public Health*. 2013;13:1041.
70. Kotloff KL, Wasserman SS, Russ K, et al. Detection of genital human papillomavirus and associated cytological abnormalities among college women. *Sex Transm Dis*. 1998;25:243-250.
71. Thomas I, Wright G, Ward B. The effect of condom use on cervical intraepithelial neoplasia grade I (CIN I). *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 1990;30:236-239.
72. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*. 1998;338:423-428.
73. Moscicki AB, Hills N, Shiboski S, et al. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA*. 2001;285:2995-3002.
74. Hogewoning CJ, Bleeker MC, van den Brule AJ, et al. Condom use promotes regression of cervical intraepithelial neoplasia and clearance of human papillomavirus: a randomized clinical trial. *Int J Cancer*. 2003; 107:811-816.
75. Winer RL, Hughes JP, Feng Q, et al. Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*. 2006; 354:2645-2654.
76. Manhart LE, Koutsky LA. Do condoms prevent genital HPV infection, external genital warts, or cervical neoplasia? A meta-analysis. *Sex Transm Dis*. 2002; 29:725-735.
77. McCallum EB, Peterson ZD. Investigating the impact of inquiry mode on self-reported sexual behavior: theoretical considerations and review of the literature. *J Sex Res* 2012;49: 212-216.
78. Fenton KA, Johnson AM, McManus S, et al. Measuring sexual behaviour: methodological challenges in survey research. *Sex Transm Infect*. 2001;77: 84–92.
79. Moreno V, Bosch FX, Muñoz N. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*. 2002;359:1085-1092.
80. Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res*. 2002; 89:191-199.
81. Lee JE, Lee S, Lee H, et al. Association of the vaginal microbiota with human papillomavirus infection in a Korean twin cohort. *PLoS One*. 2013; 8: e63514.
82. Mendoza L, Mongelos P, Paez M, et al. Human papillomavirus and other genital infections in indigenous women from Paraguay: a cross-sectional analytical study. *BMC Infect Dis*. 2013;531.



83. McIver CJ, Rismanto N, Smith C, et al. Multiplex PCR testing detection of higher-than-expected rates of cervical mycoplasma, ureaplasma, and trichomonas and viral agent infections in sexually active Australian women. *J Clin Microbiol.* 2009;47:1358-1363.
84. Moscicki AB, Hills N, Shiboski S, et al. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA.* 2001; 285:2995-3002.
85. Smith JS, Herrero R, Bosetti C. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94(21):1604-1613.
86. Newman L, Rowley J, Vander Hoorn S, et al. Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting. *PLoS One.* 2015;10(12):e0143304.
87. de Abreu AL, Malaguti N, Souza RP, et al. Association of human papillomavirus, *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* co-infections on the risk of high-grade squamous intraepithelial cervical lesion. *Am J Cancer Res.* 2016;6(6):1371-1383.
88. Simonetti AC, Melo JH, de Souza PR, et al. Immunological's host profile for HPV and *Chlamydia trachomatis*, a cervical cancer cofactor. *Microbes Infect.* 2009; 11:435-442.
89. Koskela P, Anttila T, Bjørge T, et al. *Chlamydia trachomatis* infection as a risk factor for invasive cervical cancer. *Int J Cancer.* 2000; 85:35-39.
90. Wallin KL, Wiklund F, Luostarinen T, et al. A population-based prospective study of *Chlamydia trachomatis* infection and cervical carcinoma. *Int J Cancer.* 2002; 101:371-374.
91. Bhatla N, Puri K, Joseph E, et al. Association of *Chlamydia trachomatis* infection with human papillomavirus (HPV) & cervical intraepithelial neoplasia - a pilot study. *Indian J Med Res.* 2013; 137:533-539.
92. Castle PE, Escoffery C, Schachter J, et al. *Chlamydia trachomatis*, herpes simplex virus 2, and human T-cell lymphotropic virus type 1 are not associated with grade of cervical neoplasia in Jamaican colposcopy patients. *Sex Transm Dis.* 2003; 30:575-580.
93. Silins I, Ryd W, Strand A, et al. *Chlamydia trachomatis* infection and persistence of human papillomavirus. *Int J Cancer.* 2005; 116:110-115.
94. Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, et al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine.* 2006;24: 1–10.
95. Gravitt PE. The known unknowns of HPV natural history. *J Clin Invest.* 2011 ;121(12):4593-4599.

96. Akaaboune M, Kenfack B, Viviano M, et al. Clearance and persistence of the human papillomavirus infection among Cameroonian women. *Womens Health (Lond)*. 2018;14:1745506518805642.
97. Rodriguez AC, Schiffman M, Herrero R, et al. Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. *J Natl Cancer Inst*. 2008; 100(7): 513–517.
98. Moscicki AB, Widdice L, Ma Y, et al. Comparison of natural histories of human papillomavirus detected by clinician- and self-sampling. *Int J Cancer*. 2010; 127(8): 1882–1892.
99. Plummer M, Schiffman M, Castle PE, et al. A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *J Infect Dis*. 2007; 195(11): 1582–1589.
100. Giuliano AR, Sedjo RL, Roe DJ, et al. Clearance of oncogenic human papillomavirus (HPV) infection: effect of smoking (United States). *Cancer Causes Control*. 2002;13(9):839-846.
101. Confortini M, Carozzi F, Zappa M. et al. Human papillomavirus infection and risk factors in a cohort of Tuscan women aged 18-24: results at recruitment. *BMC Infect Dis*. 2010;10:157.
102. Sammarco ML, Del Riccio I, Tamburro M, et al. Type-specific persistence and associated risk factors of human papillomavirus infections in women living in central Italy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013;168(2):222-226.