



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

Marina Carrara Dias

Análise das alterações nucleotídicas na região E6 do
Papilomavírus humano dos tipos 6 e 11 presentes em amostras
de condiloma acuminado

São José do Rio Preto
2017

Marina Carrara Dias

Análise das alterações nucleotídicas na região E6 do
Papilomavírus humano dos tipos 6 e 11 presentes em amostras
de condiloma acuminado

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.

Financiadora: FAPESP – Proc.
2015/06628-7

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marília de
Freitas Calmon

Coorientadoras: Prof^a. Dr^a. Paula
Rahal
Dr^a. Caroline Measso do Bonfim

Dias, Marina Carrara.

Análise das alterações nucleotídicas na região E6 do Papilomavírus humano dos tipos 6 e 11 presentes em amostras de condiloma acuminado / Marina Carrara Dias. -- São José do Rio Preto, 2017

71 f. : il., tab.

Orientador: Marília de Freitas Calmon

Coorientador: Paula Rahal

Coorientador: Caroline Measso do Bonfim

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Virologia. 2. Papillomaviridae. 3. Condiloma acuminado – Aspectos genéticos. 4. Sequenciamento de nucleotídeo. 5. Variação genética.

I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 616-006.5

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

Marina Carrara Dias

Análise das alterações nucleotídicas na região E6 do
Papilomavírus humano dos tipos 6 e 11 presentes em amostras
de condiloma acuminado

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.

Financiadora: FAPESP – Proc.
2015/06628-7

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Marília de Freitas Calmon
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Carolina Colombelli Pacca
Faceres – São José do Rio Preto

Dr. Ricardo Barros Mariutti
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
6 de Março de 2017

Que todos os nossos esforços estejam sempre focados no desafio à impossibilidade. Todas as grandes conquistas humanas vieram daquilo que parecia impossível.

Charles Chaplin

Dedico este projeto aos meus pais, Nilton Pereira Dias e Dulcinéia Maria Carrara, e a minha irmã, Aline Carrara Dias, por me apoiarem, acreditarem sempre em mim e por estarem sempre ao meu lado.

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Marília de Freitas Calmon, pela dedicação em ajudar em todos os momentos, pelo apoio e preocupação dedicados e por todos os conhecimentos transmitidos, que foram essenciais para o meu crescimento e aprendizagem.

Às minhas coorientadoras Prof^a Dr^a Paula Rahal e Dr^a Caroline Measso do Bonfim, pela dedicação, ajuda e ensinamentos.

À banca examinadora, pelo aceite do convite em colaborar com o meu trabalho.

A todos os colaboradores do trabalho, que possibilitaram o desenvolvimento do mesmo.

A todos os colegas do Laboratório de Estudos Genômicos, pelo companheirismo e amizade diários, além da ajuda e apoio quando necessários, os quais deram mais força para enfrentar as dificuldades.

A toda minha família, especialmente meus pais Nilton Pereira Dias e Dulcinéia Maria Carrara e minha irmã, Aline Carrara Dias, pelo incentivo e apoio, não deixando desanimar com as dificuldades.

Ao meu namorado Gabriel Machado Ferreira, pela torcida de sempre e pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

A todos os colegas do IBILCE, pela convivência, amizade e conhecimentos.

Às minhas amigas do Colégio Santo André, Jéssica Ceron, Jéssica Caldeira, Maria Laura Martins, Mayra Alves e Ludmila Toledo, pela amizade de tantos anos, companheirismo e apoio dedicados até hoje.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE, pela infraestrutura que permitiu minha formação profissional.

Aos professores da Graduação em Ciências Biológicas e Pós-Graduação em Microbiologia, pelos ensinamentos transmitidos durante esses anos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do IBILCE/UNESP pela oportunidade de especialização.

Ao apoio financeiro da FAPESP e CAPES.

A Deus.

RESUMO

Condiloma acuminado (CA) ou verrugas genitais são lesões proliferativas benignas epidérmicas ou mucosas. O condiloma é causado pela infecção pelo papilomavírus humano (HPV), principalmente os tipos de baixo-risco 6 e 11, mas também pode ocorrer coinfeção com os HPVs de alto-risco. As variantes dos HPVs são definidas como sequências virais que compartilham identidade na sequência nucleotídica do gene L1 maior que 98%. Baseado nesse critério, linhagens de variantes de HPV6 e 11 têm sido estudadas e ainda há uma tentativa de correlacionar essas variações genéticas com os resultados clínicos diferenciais da infecção. Dessa forma, o objetivo do estudo foi detectar as variantes e alterações nucleotídicas presentes em E6 do HPV dos tipos 6 e 11 presentes em amostras de condiloma acuminado, correlacionar a presença de HPV com os dados clínico-patológicos das pacientes e determinar as relações filogenéticas das variantes encontradas com variantes de outras partes do mundo. A região E6 de 32 amostras de condiloma acuminado foi sequenciada, sendo dessas 25 positivas para HPV6 e sete para HPV11. Entre as amostras HPV6, 12 foram identificadas como a variante HPV6a, apresentando a mutação nucleotídica G474A, sendo uma delas também apresentando a mutação T369G no genoma. As 13 pacientes restantes foram positivas para a variante HPV6vc, não apresentando alterações nucleotídicas. Na análise das amostras HPV11, observou-se que todas as pacientes mostraram as mutações T137C e C380T. Além disso, uma paciente também apresentou a alteração nucleotídica T410C. Nenhuma das alterações nucleotídicas encontradas apresentou troca de aminoácido. Na análise estatística, foi possível observar uma associação significativa entre a coinfeção de HPV com HIV e também foi observada uma associação significativa entre a infecção por HPV11 e o consumo de bebida alcoólica. Os demais dados analisados não mostraram associação

significante. Na análise filogenética foi possível observar o agrupamento das amostras de acordo com suas variantes, não mostrando relação com a região geográfica as quais foram isoladas.

Palavras-chave: Alteração nucleotídica, HPV6, HPV11, condiloma acuminado.

ABSTRACT

Condyloma acuminatum (CA) or genital warts are benign proliferative lesions that can be epidermal or mucous. Condyloma is caused by infection with human papillomavirus (HPV), mainly the low-risk types 6 and 11, but can also occur coinfection with high-risk HPVs. Human papillomaviruses have the capacity to infect the skin, oral and genital mucosa, and induce benign or malignant proliferative lesions. The variants of HPVs are defined as viral sequences that share identity in the nucleotide sequence of the L1 gene greater than 98%. Based on this criterion, HPV6 and 11 variants lineages have been studied and there is still an attempt to correlate these genetic variants with different clinical findings of infection. In this way, the aim of this study was to detect variants and nucleotide alterations presents in E6 region of HPV types 6 and 11 detected in condyloma acuminatum samples, to correlate the HPV presence with the clinical-pathological data of the patients and to determine phylogenetic relations of variants found with variants of others places of the world. The E6 region of 32 samples of condyloma were sequenced, being 25 positive to HPV6 and seven diagnosed HPV11. Twelve samples were identified as the HPV6a variant, and presented the mutation G474A, and one of these also showed the mutation T369G. The others 13 patients were positive to HPV6vc without nucleotide alterations. In the analysis of the seven HPV11 samples, it was observed that all patients showed the mutations T137C and C380T. Besides that, one patient also present the nucleotide alteration T410C. None of the mutations showed amino acid change. In the statistical analysis, it was observed a significant association between the HPV and HIV coinfection, and it was also found a significant association between HPV11 and alcohol consumption. Others data analyzed did not show significant association. In the phylogenetic analysis, it was observed that the samples

were grouped according to variants, showing no relation to the geographical region that they were isolated.

Keywords: Nucleotide alteration, HPV6, HPV11, condyloma acuminatum.

SUMÁRIO

Capítulo I	16
1. Introdução	17
1.1. Condiloma acuminado	17
1.2. Papilomavírus	19
1.2.1. Papilomavírus Humano (HPV)	20
1.3. Ciclo de vida	23
1.4. Transmissão	25
1.5. Prevenção	26
1.6. Variantes de HPV	27
2. Justificativa	28
3. Objetivos	30
4. Material e Métodos	30
4.1. Casuística	30
4.2. Amplificação da região E6	31
4.3. Clonagem	32
4.4. Detecção das alterações nucleotídicas	33
4.5. Análise das sequências	34
4.6. Análise Estatística	35
4.7. Análise Filogenética	35
5. Referências Bibliográficas	36
Capítulo II	45
Artigo Científico	46
Abstract	47

1. Introduction	48
2. Methods	50
2.1. Clinical samples.....	50
2.2. E6 Amplification.....	50
2.3. Cloning	50
2.4. Nucleotide alterations detection.....	51
2.5. Sequence analysis	51
2.6. Statistical analysis	52
2.7. Phylogenetic analysis	52
3. Results	52
3.1. Casuistic.....	52
3.2. Nucleotide alterations detection.....	53
3.3. Phylogenetic analysis	54
3.3.1. HPV6.....	54
3.3.2. HPV11.....	54
4. Discussion.....	55
5. Conclusion	58
6. Acknowledgements	59
7. References.....	59
Capítulo III	70
1. Conclusões	71

Lista de Figuras e Tabela

Capítulo I

Figura 1. Representação do genoma completo do papilomavírus humano.....	21
Figura 2. Representação do ciclo de vida do papilomavírus humano nas células do hospedeiro.....	24

Capítulo II

Table 1. Characterization of the 32 samples regarding to Age, Lesion, HIV coinfection, Alcohol consumption and tobacco smoking	66
Figure 1. Nucleotide alterations in E6 gene of HPV6 (A) and HPV11 (B) isolates.....	67
Figure 2. Unrooted phylogenetic tree of HPV6 variants of condyloma acuminatum or genital warts samples	68
Figure 3. Unrooted phylogenetic tree of HPV11 variants of condyloma acuminatum or genital warts samples	69

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

CA – Condiloma acuminado (*Condyloma acuminatum*)
DNA – Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)
dNTP - Desoxinucleotídeo trifosfato (*Deoxynucleotide triphosphate*)
E. coli – *Escherichia coli*
EDTA – Ácido etilenodiamino-tetracético (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)
F – *Forward*
HIV – Vírus da imunodeficiência humana (*Human immunodeficiency virus*)
HPV – Papilomavírus humano (*Human papillomavirus*)
kb – Quilobase (*Kilobase*)
LB – *Luria-Bertani broth*
LCR – Região longa de controle (*Long Control Region*)
M – Molar
mg – Miligrama (*Milligram*)
MgCl₂ – Cloreto de magnésio (*Magnesium chloride*)
mL – Mililitro (*Milliliters*)
mM – Milimolar (*Millimolar*)
ng – Nanograma (*Nanogram*)
nm – Nanômetro
pb – Pares de base (*Base pairs*)
PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*)
pmol – Picomol
pRb – Proteína retinoblastoma (*Retinoblastoma protein*)
R – *Reverse*
Ref. – Referência (*Reference*)
rpm – Rotações por minuto (*Rotations per minute*)
U – Unidade (*Unit*)
URR – *Upstream regulatory region*
VLP – *Virus-like particle*
μL – Microlitro (*Microliters*)

Capítulo I

1. Introdução

1.1. Condiloma acuminado

Condiloma acuminado (CA) ou verrugas genitais são lesões proliferativas benignas epidérmicas ou mucosas, as quais podem se desenvolver em massas anogenitais, sendo, nesses casos, mais difíceis de serem tratadas com as terapias comuns (AKHAVIZADEGAN, 2015; PETRÁ, 2015). As verrugas genitais não são graves como os carcinomas, mas podem causar sintomas desagradáveis, como prurido e dor. Tais sintomas ocasionam constrangimento considerável e sequelas psicosssexuais nas pacientes (PETRÁ, 2015).

O condiloma é uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns e é causado pela infecção pelo papilomavírus humano (HPV), principalmente os tipos de baixo-risco 6 e 11, mas também pode ocorrer coinfeção com os HPVs de alto-risco, como o 16 e o 18 (GARLAND et al., 2009; LÉONARD et al., 2014; SUZUKI et al., 2016). As lesões relacionadas aos tipos 6 e 11 do HPV tem menor risco de transformação maligna, enquanto as infecções pelos tipos 16 e 18 apresentam maior chance de desenvolver câncer anal ou cervical (HEMPER et al., 2016).

Embora os dois principais tipos de HPV associados às verrugas genitais sejam de baixo risco e, por isso, não estão relacionados ao câncer, a infecção por tipos de alto risco em mulheres com histórico de condiloma aumenta o risco das mesmas desenvolverem neoplasia intraepitelial cervical e câncer (KJÆR et al., 2007). O câncer cervical está entre os tipos mais comuns que afetam as mulheres do mundo todo. Estima-se que ocorram 528.000 novos casos por ano, sendo 266.000 casos de morte em 2012 relacionados ao carcinoma cervical (TAYLOR et al., 2016).

Mulheres infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) são mais susceptíveis à infecção pelo HPV. A deficiência nas células da imunidade devido à infecção por HIV resulta na instabilidade dos

anticorpos que combatem os papilomavírus humanos de alto risco, levando à persistência do vírus e a progressão das lesões (BARROSO, 2013; EZECHI et al., 2014). Apesar da maior probabilidade de persistência viral nas mulheres HIV positivas, foi observado que, assim como as mulheres HIV-negativas, as positivas para o HIV também mostraram regressão das verrugas no primeiro ano após o diagnóstico, embora em menor porcentagem (PARK et al., 2015).

A transmissão do condiloma é considerada sexual, devido à relação com a infecção por HPV, a qual é transmitida via contato pele com pele. Dessa forma, as lesões são mais comumente encontradas na região perianal, porém, podendo ocorrer também nas regiões vaginal, cervical, oral e laringeal (LÉONARD et al., 2014; HEMPER et al., 2016). A maior prevalência de condiloma ocorre nos anos iniciais da atividade sexual, sendo o tempo entre a infecção pelo HPV e o desenvolvimento da doença variando entre dois e seis meses (GARLAND et al., 2009; LÉONARD et al., 2014).

Pelo fato da infecção ser caracterizada pelo desenvolvimento de verrugas genitais, os condilomas acuminados são diagnosticados por meio da inspeção visual em busca de lesões características (SUZUKI et al., 2016). No entanto, também pode ser utilizado o ácido acético 2-5% a fim de detectar potenciais múltiplos sítios envolvidos (LÉONARD et al., 2014).

A fim de determinar o risco de transformação maligna, é necessário obter uma biópsia da lesão antes de iniciar o tratamento (HEMPER et al., 2016). O tratamento utilizado para os condilomas acuminados pode divergir. Podem ser utilizadas técnicas de remoção da verruga, como a eletrocirurgia, excisão cirúrgica, crioterapia, curetagem e laser, além de métodos de tratamento com agentes citotóxicos tópicos, como por exemplo o creme *imiquimod* 5%, solução *podophyllotoxin* 0.5% e ácido tricloroacético, os quais podem ser aplicados pelas pacientes ou por profissionais (BRAUN; GERBER, 2016; YANG et al., 2016). Independente

do tratamento escolhido, a resposta pode ser variável (de 60% a 90% de sucesso), podendo causar efeitos adversos, como ulceração, dor, cicatrizes e, no caso de mulheres grávidas, pode potencializar malformação fetal e contração do útero (HILLEMANN et al., 2008; BRAUN; GERBER, 2016; YANG et al., 2016).

Alguns pacientes apresentam alta susceptibilidade para o desenvolvimento de lesão e rápida progressão, além de uma alta taxa de recorrência do condiloma (NIAZY et al., 2015). Além disso, os indivíduos imunodeficientes também apresentam dificuldades na validação de uma terapia eficiente (NIAZY et al., 2015). Nesses casos mais graves, os agentes citotóxicos não são suficientes para o tratamento. Assim, podem ser necessárias estratégias como cirurgia e radiação (NIAZY et al., 2015; HEMPER et al., 2016).

As verrugas genitais ocasionadas pelos HPVs dos tipos 6 e 11 podem resultar em um crescimento descontrolado em raras ocasiões, podendo levar ao desenvolvimento do condiloma gigante, conhecido como Buschke-Lowenstein (PIM; BANKS, 2010). Tanto os condilomas gigantes, como as simples verrugas genitais não são letais, porém, implicam em um custo significativo para os sistemas de saúde do mundo, sendo assim, tornam-se cada vez mais importantes os estudos para a prevenção dessa doença (PIM; BANKS, 2010).

1.2. Papilomavírus

Os papilomavírus possuem um capsídeo icosaédrico de 52–55 nm de diâmetro e possuem DNA circular dupla fita com genoma contendo aproximadamente 8 kb (DUNOWSKA et al., 2013). Estes organismos são agrupados na família Papillomaviridae, a qual possui uma enorme diversidade genética, sendo identificados até o presente momento mais de 200 tipos de papilomavírus em uma grande variedade de espécies,

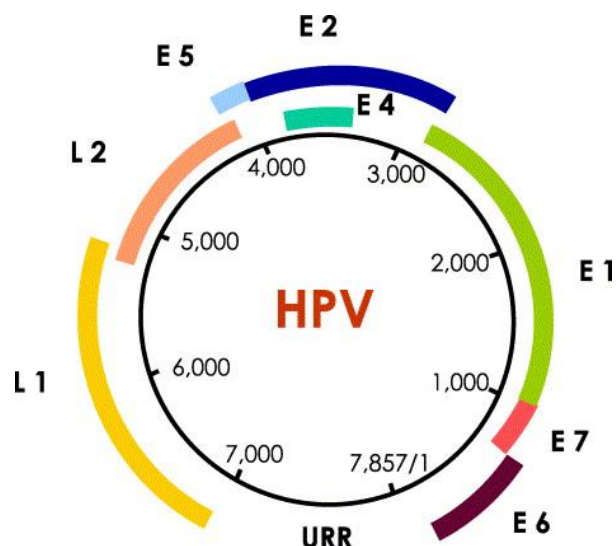
sendo que muitos deles infectam humanos (BERNARD et al., 2010; LANGE et al., 2013).

Os vírus dessa família tem a capacidade de infectar o epitélio escamoso, tanto da pele quanto da mucosa oral e genital, e induzir lesões proliferativas benignas ou malignas, como por exemplo as verrugas e o câncer, e só completam seu ciclo de vida nesses tecidos (STANLEY, 2010; BATISTA et al., 2011; DUNOWSKA et al., 2013). Além disso, são vírus espécie-específicos, ou seja, os papilomavírus humanos (HPV) infectam apenas humanos, os papilomavírus bovinos, apenas bois e vacas, e assim por diante (STANLEY, 2010).

1.2.1. Papilomavírus Humano (HPV)

Atualmente já foram identificados mais de 200 genótipos de HPV, que estão categorizados dentro de cinco gêneros (alpha, beta, gamma, mu e nu), baseado nas suas sequências genômicas (WANG; RODEN, 2013). Os tipos de HPV são estabelecidos quando a sequência de DNA da L1 do genoma viral clonado difere de qualquer outro tipo caracterizado por pelo menos 10% (Figura 1) (VILLIERS, DE et al., 2004; BERNARD et al., 2010).

Figura 1. Representação do genoma completo do papilomavírus humano 16, representando os genes iniciais e tardios. Fonte: (MUÑOZ et al., 2006).



Diferentes tipos de HPV infectam o epitélio mucoso ou a pele, sendo divididos em HPV cutâneo e HPV mucoso. Os primeiros normalmente persistem por muitos anos na pele de indivíduos saudáveis ou podem estar relacionados com lesões benignas na pele e câncer de pele não-melanoma (HAZARD et al., 2007; PINO, DEL et al., 2012). Já os tipos de HPV mucosos são encontrados no epitélio do trato anogenital e outras áreas mucosas do corpo, como o trato respiratório, e pertencem ao gênero *Alphapapillomavirus* (PINO, DEL et al., 2012). Estes HPVs são classificados de acordo com seu potencial oncogênico, podendo ser de baixo-risco, sendo os tipos 6 e 11 os mais comuns, os quais são encontrados principalmente em verrugas genitais e em papilomatoses de laringe; ou de alto-risco, como por exemplo os tipos 16, 18, 31, 33, 35, os quais estão frequentemente associados ao câncer (SUTHIPINTAWONG et al., 2011; TORRENTE et al., 2011; PINO, DEL et al., 2012; MAKIYAMA et al., 2013).

Estima-se que, aproximadamente, 14 milhões de pessoas por ano adquirem o papilomavírus humano (PARK et al., 2015). No entanto, nem toda infecção por HPV irá desenvolver algum tipo de lesão.

Aproximadamente 90% dos indivíduos infectados não irão apresentar sintomas, mas ainda poderão transmitir o vírus (STANLEY, 2006; NIAZY et al., 2015). Tal fator se deve à ação do sistema imunológico, o qual irá eliminar a maioria das infecções por HPV. Apesar de sua ação, 10% das pessoas irão apresentar infecção permanente pelo vírus, podendo, então, desenvolver lesões proliferativas benignas, lesões precursoras de alto grau e carcinomas invasivos (STANLEY, 2006; NIAZY et al., 2015).

O genoma do HPV compreende três regiões funcionais: uma região não codificante, chamada de região longa de controle (LCR ou URR – “*upstream regulatory region*”), a qual está envolvida na regulação da transcrição e replicação do HPV; região codificadora dos genes iniciais (E1, E2, E4, E5, E6 e E7), que regulam as fases vegetativas e produtivas do ciclo viral; e a região codificadora dos genes tardios, L1 e L2, que codificam as proteínas do capsídeo principal e secundária, respectivamente (Figura 1) (BOCCARDO; LEPIQUE; VILLA, 2010; FERENCZI et al., 2013).

As proteínas E6 e E7 dos HPVs de alto-risco são as responsáveis pela carcinogênese. A primeira se liga à ubiquitina ligase (E6AP) celular e este complexo degrada a proteína p53 e bloqueia a apoptose celular, enquanto a E7 desregula o ciclo celular por meio da ligação à proteína retinoblastoma (pRb), inativando sua função devido ao fato de impedir sua ligação com um fator de transcrição (E2F), o qual deveria prevenir a entrada na fase S do ciclo celular (GANGULY; PARIHAR, 2009; MARTINEZ-ZAPIEN et al., 2016). Além de bloquear a apoptose, a proteína E6 do HPV de alto-risco pode ativar a telomerase, afetar a adesão celular, diferenciação do epitélio e polaridade, alterar a transcrição, além de reduzir o reconhecimento imune das células infectadas pelo vírus (PANG; THIERRY, 2013; ILLIANO et al., 2016). Esses fatores resultam na proliferação celular, perda da regulação do ciclo celular, diferenciação celular descontrolada, aumento de mutações e

instabilidade cromossomal, levando a formação de tumores (SUBRAMANIAN; CHINNAPPAN, 2013).

As proteínas E6 dos HPVs de baixo-risco não são capazes de desempenhar com eficiência as funções das proteínas dos papilomavírus humanos de alto risco. Por exemplo, tais proteínas não são capazes de degradar a p53, mas podem aprisioná-la no citoplasma (WALLACE; GALLOWAY, 2015). Em vez disso, a E6 dos HPVs de baixo-risco interage com a p300 a fim de reduzir a acetilação e ativação de p53, inibindo, assim, a apoptose em resposta ao dano no DNA e não tem a capacidade de ativar a telomerase (WALLACE; GALLOWAY, 2015). Tais fatores diminuem o potencial de agente transformante dessa proteína nos HPVs de baixo-risco (WALLACE; GALLOWAY, 2015).

A proteína E7 dos HPVs de baixo-risco também apresenta diferenças se comparada aos HPVs de alto-risco. Ao contrário do que se observa nos últimos tipos, em HPV de baixo-risco a E7 se liga fracamente à pRb e não provoca a sua degradação. Dessa forma não há o descontrole da replicação celular como na formação de um carcinoma e, além disso, essa proteína não consegue estimular a instabilidade do genoma, como no caso dos HPVs de alto-risco (DOORBAR et al., 2015; PICCIOLI et al., 2010).

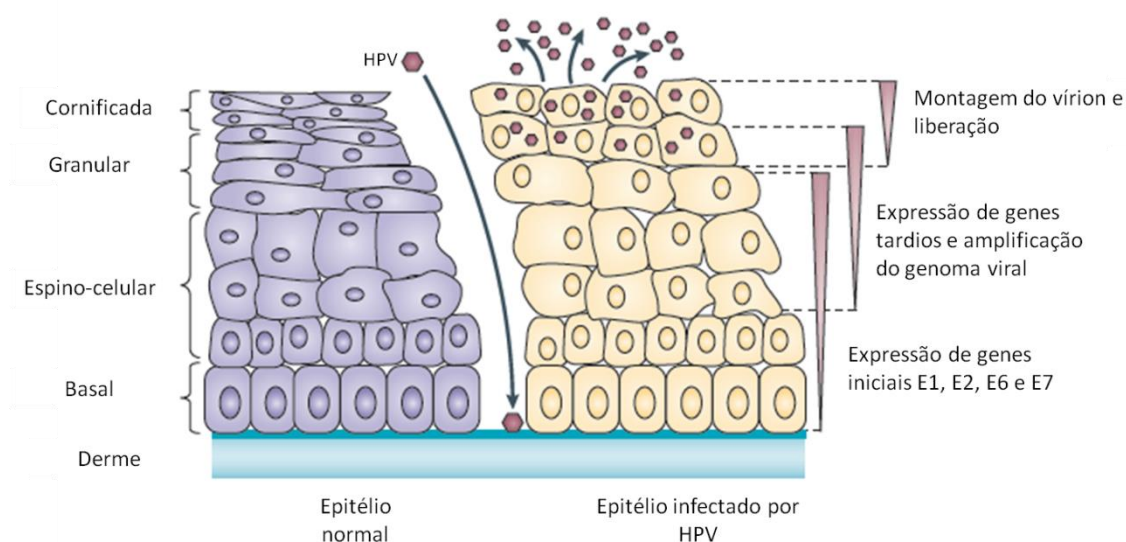
Essas características das proteínas dos HPVs de baixo-risco fazem com que ocorra uma maior proliferação celular com o genoma viral, mas não de forma descontrolada como na formação de um carcinoma. Apesar das diferenças em relação aos potenciais neoplásicos, ambas as proteínas de HPV de alto e baixo-risco tem funções comuns durante o ciclo de infecção viral: manutenção e replicação do genoma viral (GENOVESE et al., 2011).

1.3. Ciclo de vida

O ciclo de vida do papilomavírus humano se inicia quando partículas infecciosas atingem as células da camada basal do epitélio. A

partir da infecção viral, a replicação pode ser dividida em duas partes: a replicação basal do DNA viral e a diferenciação e liberação da partícula viral (Figura 2) (DOORBAR, 2005; MUÑOZ et al., 2006; WALLACE; GALLOWAY, 2015).

Figura 2. Representação do ciclo de vida do papilomavírus humano nas células do hospedeiro. A infecção pelo HPV requer a disponibilidade da camada basal, a qual ocorre normalmente em microlesões da pele ou mucosa. As células infectadas dividem e espalham. Algumas células migram para a camada suprabasal, onde os genes virais são ativados. Nesse local, o DNA viral é replicado e as proteínas do capsídeo são formadas. As partículas virais são formadas e liberadas na superfície, podendo infectar novos tecidos. Fonte: Modificado de Moody; Laimins, 2010.



Inicialmente, o genoma viral é replicado a um número de cópias próximo de 100 e mantido por um período de tempo com um baixo número de cópias dentro das células infectadas, as quais continuam replicando e, assim, repassando o genoma viral para as células-filhas. Nesse processo de replicação basal do DNA, as proteínas virais E1 e E2 são essenciais. Posteriormente, uma vez que as células basais passam para o compartimento suprabasal, elas perdem a habilidade de se dividir e iniciam a diferenciação. Nessa etapa, o vírus replica e, para sua liberação no ambiente, aproveitam a desintegração das células epiteliais nas

camadas superficiais da pele (DOORBAR, 2005; MUÑOZ et al., 2006; WALLACE; GALLOWAY, 2015).

No processo de replicação do vírus, as proteínas E6 e E7 são de extrema importância, pois interagem com proteínas celulares. Essas interações se mostraram responsáveis pela indução da proliferação e imortalização e transformação maligna das células. A constante atividade dessas proteínas virais leva a um aumento da instabilidade genômica, acúmulo de mutações, perda do controle de crescimento e, conseqüentemente o desenvolvimento do câncer. Durante a progressão do tumor, o DNA viral se integra no cromossomo da célula hospedeira, resultando em um constante nível das oncoproteínas virais (DOORBAR, 2005; MUÑOZ et al., 2006).

A fim de montar as partículas virais infecciosas do papilomavírus, ocorre a expressão das proteínas estruturais L1 e L2. Tais proteínas irão compor o capsídeo viral e são transcritas durante a fase tardia da amplificação do vírus (WALLACE; GALLOWAY, 2015).

1.4. Transmissão

A transmissão do papilomavírus humano ocorre por meio do contato direto com a pele ou mucosa infectada. A principal forma é pela via sexual, que inclui contato oral-genital, genital-genital ou mesmo manual-genital. Ainda não está comprovada a possibilidade de contaminação por meio de objetos, do uso de vaso sanitário e piscina ou pelo compartilhamento de toalhas e roupas íntimas. A transmissão pode ser facilitada quando as lesões clínicas estão presentes, já que foi demonstrado que 64% dos parceiros sexuais de indivíduos portadores de condilomas genitais desenvolveram lesões semelhantes (INCA).

A transmissão em crianças pode ser durante o nascimento, por meio da exposição enquanto atravessa o canal vaginal de uma mãe infectada, exposição ao vírus no fluido amniótico ou abuso infantil

(KNEPPER; EKLUND, 2014; WILCOX, et al., 2014). Um estudo mostrou que a presença persistente de HPV no colo do útero e na cavidade oral da mãe está associada ao risco de infecção por HPV na infância (TAI et al., 2012).

1.5. Prevenção

Além do tratamento das lesões, tem-se investido muito no desenvolvimento de vacinas contra os principais tipos de HPV. Atualmente, existem três vacinas utilizadas na prevenção do papilomavírus humano. A vacina bivalente protege contra os HPVs 16 e 18 (Cervarix), enquanto a vacina tetravalente atinge os HPVs 16, 18, 6 e 11 (Gardasil) (HOULIHAN et al., 2013; WIERZBICKA et al., 2014). Além das duas vacinas mais comuns contra o papilomavírus humano, foi aprovada a vacina 9-valente (Gardasil 9), a qual inclui mais cinco tipos de HPV (tipos 31, 33, 45, 52 e 58), os quais tem sido encontrados em lesões neoplásicas associadas a esse vírus (CASTELLSAGUÉ et al., 2016).

As vacinas disponíveis atualmente contra HPV são do tipo “virus-like particles” – VLPs, que consiste em partículas virais da proteína maior do envelope (L1) dos HPVs dos tipos 6, 11, 16 e 18 (no caso da vacina tetravalente), sem DNA, as quais são estruturas não infecciosas que simulam a infecção natural do HPV (GONÇALVES et al., 2014). A vacina 9-valente tem uma composição similar à tetravalente, consistindo em partículas virais da proteína L1, a fim de induzir a resposta imune contra o HPV (YANG; BRACKEN, 2016).

A vacina tetravalente, a qual é utilizada no sistema de saúde atualmente, previne, aproximadamente, 82% dos condilomas, além de eliminar os tipos de alto risco que são comumente encontrados em coinfeções (GARLAND et al., 2009). Por esse motivo, os condilomas têm sido utilizados no monitoramento da eficiência dos programas de vacinação contra o HPV (STUREGÅRD et al., 2013). Com relação a

vacina mais recente aprovada, foi observado em um estudo abrangendo o Brasil, México, Índia e China, que a inclusão desses tipos de HPV na vacina aumentou a prevenção de carcinoma cervical invasivo em 12 a 19% das mulheres. Juntos, os tipos de HPV presentes na vacina 9-valente representam 90% dos casos de carcinoma cervical invasivo (SERRANO et al., 2014).

Dessa forma, ainda são necessários muitos estudos visando o tratamento e a prevenção do HPV, devido ao grande problema de saúde pública que esses vírus acarretam. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, uma maior redução de ocorrência de doenças relacionadas ao HPV seria atingida com a combinação de estratégias a fim de aumentar a cobertura contra o HPV associadas a ferramentas de monitoramento mais apropriadas (KURY et al., 2013).

1.6. Variantes de HPV

As variantes do papilomavírus humano são definidas como sequências virais que compartilham identidade na sequência nucleotídica do gene L1 maior que 98%. Baseado nesse critério, linhagens de variantes de HPV6 e 11 têm sido estudadas e ainda há uma tentativa de correlacionar essas variações genéticas com os resultados clínicos diferenciais da infecção (GODÍNEZ et al., 2013).

As diferenças na agressividade entre os HPVs 6 e 11 e entre diferentes casos do mesmo genótipo podem ser devido às variantes genéticas intratípicas. As regiões menos conservadas, como a região longa de controle (LCR) e as regiões dos genes E6 e E7, são úteis para determinar as variantes genéticas. Até os dias atuais, a associação entre variação genética e as diferenças na doença clínica permanece incerta.

As variantes do HPV16 são as mais estudadas até o momento, devido ao alto grau oncogênico desse genótipo de HPV. Tem-se observado que variações na sequência da LCR do HPV16 podem

modular o potencial oncogênico desse tipo de HPV, como por exemplo as mudanças nucleotídicas dentro da região reguladora que influenciam a replicação e transcrição por meio do seu efeito na formação do complexo da proteína no DNA. Diversas variações nas sequências nucleotídicas foram encontradas na LCR do HPV16, contribuindo para o mecanismo alternativo envolvido na oncogênese do HPV16. Nesses casos, observou-se uma correlação entre a infecção por HPV16 e progressão do câncer cervical (PIENTONG et al., 2013).

As variações estudadas nos HPVs de alto-risco também podem ser encontradas nas sequências dos HPVs de baixo-risco, incluindo os HPVs 6 e 11, podendo estar associadas às diferenças no potencial patogênico. No entanto, esta questão ainda não é bem estabelecida fora dos tipos de HPV de alto-risco (GALL et al., 2013).

Com os estudos realizados a fim de determinar as variantes dos HPVs de baixo-risco, os isolados de HPV6 podem ser caracterizados dentro de três variantes: HPV6a, HPV6b e HPV6vc. Diferente do HPV6, o HPV11 possui uma sequência protótipo (M14119) e uma variante bem descrita do banco de dados (EU918768) (CHANSAENROJ et al., 2012; DANIELEWSKI et al., 2013). Essas variantes podem estar relacionadas ao maior ou menor grau de agressividade das doenças ocasionadas por esses tipos.

2. Justificativa

As variantes dos HPVs podem apresentar diferenças na história natural e na patogenicidade, pois podem ser funcionalmente diversas nas propriedades biológicas, moleculares e químicas. A diversidade genômica pode ocasionar diferentes interações com mecanismos celulares do hospedeiro, podendo ter um significativo impacto no curso clínico de diferentes doenças associadas ao HPV (MAMMAS et al., 2014). Dessa forma, cada variante genômica pode apresentar manifestação e curso

clínico da doença específicos. A análise dessa diversidade pode ser utilizada nas estratégias futuras de vacinas, para que se possa estimar sua eficácia em indivíduos imunocomprometidos e para monitorar o curso clínico da doença (MAMMAS et al., 2014).

As alterações nucleotídicas no genoma do vírus podem gerar substituições de aminoácidos e, conseqüentemente, possíveis alterações das características bioquímicas de suas proteínas. Essas variações podem alterar a montagem viral, o potencial carcinogênico e afetar a resposta imunológica do hospedeiro. Além disso, ainda não se sabe se a imunidade para uma variante de HPV pode proteger o hospedeiro contra a infecção por uma outra variante do vírus. Dessa forma, a identificação das alterações nucleotídicas em alguns casos clínicos pode ser importante para o diagnóstico, a terapia e estratégias de vacinação (SICHERO; VILLA, 2006; MINOSSE et al., 2010).

Os estudos de diversidade genômica do papilomavírus humano também são importantes para o estabelecimento de uma base de dados com a finalidade de diagnóstico, estudos genótipo-fenótipo e análise filogenética (FUJINAGA et al., 1995).

Estudos tem observado que as variações nas sequências da proteína E6 de HPVs de alto-risco, como o HPV16 e 31, podem ser parcialmente responsáveis pelas diferenças no potencial oncogênico (FERENCZI et al., 2016; ZACAPALA-GÓMEZ et al., 2015). Embora os HPVs de baixo-risco, principalmente os tipos 6 e 11, sejam comumente relacionados a doenças não malignas, esses tipos também tem sido associados a lesões epiteliais que podem progredir para patologias mais agressivas (DANIELEWSKI et al., 2013). Por esse motivo, também estão sendo estudadas as variações nas regiões E6 e E7 dos HPVs de baixo-risco, pois podem estar relacionadas à maior agressividade da doença em alguns pacientes.

O estudo de Danielewski e colaboradores (2013), identificou alterações nucleotídicas nas regiões LCR, E6 e E7 dos HPVs dos tipos 6

e 11 presentes em amostras epiteliais orais e anogenitais da Austrália, as quais podem estar relacionadas com a progressão das lesões (DANIELEWSKI et al., 2013). Além disso, também já foram descritas variações nas sequências de E6 dos HPVs 6 e 11 em amostras de papilomatose respiratória recorrente (MATOS, DE et al., 2013).

Por serem de extrema importância no descontrole da proliferação celular ocasionada pelo HPV, as sequências dos oncogenes E6 e E7 têm sido cada vez mais estudadas, devido às alterações nucleotídicas que podem ocorrer no genoma do papilomavírus humano. Essas mutações podem resultar em uma alteração na expressão das proteínas, podendo aumentar ou diminuir os danos causados por esses vírus.

3. Objetivos

Detectar as variantes e alterações nucleotídicas presentes em E6 do papilomavírus humano dos tipos 6 e 11 presentes em amostras de condiloma acuminado, correlacionar a presença de HPV com os dados clínico-patológicos das pacientes e determinar as relações filogenéticas das variantes encontradas com variantes de outras partes do mundo.

4. Material e Métodos

4.1. Casuística

Foram utilizadas 25 amostras positivas para HPV6 e sete amostras positivas para HPV11, provenientes de biópsias obtidas por secção cirúrgica de lesões genitais, assim como amostras de esfregaço citológico, de pacientes atendidas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em Ribeirão Preto. Um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi obtido de todas as pacientes do estudo pelo médico responsável pelo procedimento no momento da retirada da lesão. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em

Pesquisa do IBILCE/UNESP na cidade de São José do Rio Preto, tendo o parecer nº1.529.236.

4.2. Amplificação da região E6

O DNA das amostras foi extraído utilizando a metodologia do fenol/clorofórmio (ISOLA et al., 1994) e a integridade do DNA foi avaliada por reação em cadeia da polimerase amplificando o gene da β -globina. A genotipagem do HPV foi realizada por sequenciamento pelo método de Sanger (SANGER et al., 1977) utilizando os oligonucleotídeos iniciadores PGM09/11 e GP5+/6+ (FUESSEL et al., 2004).

Para a detecção das mutações nos HPVs dos tipos 6 e 11 presentes nas amostras de condiloma acuminado, foi amplificada a região inteira do gene E6 utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para essa região (HPV6: F: 5' GGGGGATCCGAATTCATGGAAAGTGCAAATGC 3' e R: 3' GTGAAGCTTGGATCCTAGGGTAACATGTCTTCC 5'; HPV11: F: 5' AAAATTAGCAGACGAGGCATT 3' e R: 3' CCACCTTGTCCACCTCATCT 5'), por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A reação para amplificação da E6 compreendeu em 50 μ L, contendo Tampão 1X, $MgCl_2$ (1,5 mM), dNTP mix (0,256 mM), oligonucleotídeos iniciadores (0,48 mM), 2,4 U Phusion Hot Start II High Fidelity DNA Polymerase (*Thermo Scientific*) e 600 ng de DNA extraído das amostras de condiloma acuminado. Todas as reações foram realizadas com um controle negativo (sem DNA) e um controle positivo, utilizando DNA de amostras de papilomatose de laringe positivas para os HPVs dos tipos 6 ou 11.

As ciclagens para amplificação do HPV6 compreenderam um passo inicial de 30 segundos a 98°C para a ativação da enzima, seguido de 35 ciclos de: dez segundos a 98°C, 30 segundos a 55°C, que é a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores e 30 segundos a 72°C. Após os 35 ciclos, seguiu-se um passo final de oito

minutos a 72°C, para a extensão final. As ciclagens para amplificação do HPV11 compreenderam um passo inicial de 30 segundos a 98°C para a ativação da enzima, seguido de 35 ciclos de: dez segundos a 98°C, 30 segundos a 52°C, que é a temperatura de anelamento do oligonucleotídeo iniciador e 30 segundos a 72°C. Após os 35 ciclos, seguiu-se um passo final de oito minutos a 72°C, para a extensão final. Os produtos das amplificações foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose 1% para a visualização das bandas, com tamanho correspondente a aproximadamente 500 pb.

A purificação do DNA amplificado na reação de PCR foi realizada utilizando o Kit de Purificação *QIAquick PCR Purification (Qiagen)*, seguindo as instruções do fabricante. Algumas amostras apresentaram bandas inespecíficas na reação de amplificação. Por esse motivo, todo o volume da reação foi submetido à corrida eletroforética em gel de agarose 1%, sendo a banda de interesse excisada e o DNA purificado utilizando o Kit *Zymoclean™ Gel DNA Recovery*, seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, o DNA dos produtos purificados foi quantificado no *NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific)*.

4.3. Clonagem

A fim de obter maior confiabilidade nos dados obtidos no sequenciamento, a E6 amplificada de cada paciente foi ligada ao vetor de clonagem pJET1.2/blunt do kit *CloneJET PCR Cloning (Thermo Scientific)* seguindo as instruções do fabricante. A concentração de purificado utilizada para as reações foi de 50 ng/μL. Brevemente, foram adicionados 10 μL de Tampão 2X, 50 ng do vetor de clonagem pJET1.2/blunt, 50 ng de purificado e 5 U de T4 DNA ligase. A reação foi misturada e centrifugada de 3 a 5 segundos. Em seguida, foi incubada por 20 minutos a temperatura ambiente e, posteriormente, transformada em bactérias competentes.

Foram utilizados 2 µL dos produtos clonados para transformar bactérias quimicamente competentes *Escherichia coli* da linhagem DH5α Z, pelo método de choque térmico, permanecendo cinco minutos no gelo após a inoculação do plasmídeo. Posteriormente as amostras foram plaqueadas em placas de petri contendo meio LB sólido e 0,1 mg/mL do antibiótico Ampicilina, ao qual as bactérias transformadas são resistentes. As amostras plaqueadas foram incubadas a 37°C por 16 horas.

Após o crescimento das bactérias, foram selecionadas cinco colônias de cada amostra, as quais foram incubadas em meio LB líquido contendo 0,1 mg/mL de Ampicilina, a 37°C, por 16 horas, a 250 rpm.

Após o crescimento das bactérias, o DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas Life Sciences, Canadá) seguindo as instruções do fabricante.

4.4. Detecção das alterações nucleotídicas

Os produtos purificados foram sequenciados pelo método dideoxi-terminal fluorescente utilizando-se o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems/Life Technologies, Foster City, CA, USA). As amostras foram sequenciadas em um sequenciador 3130xl *Genetic Analyser* (Applied Biosystems), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores do vetor de clonagem (F: 5' CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC 3' e R: 3' AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG 5'), a fim de evitar perda da sequência de interesse.

Anterior à reação de sequenciamento, os clones das amostras foram submetidos a uma temperatura de 95°C por 10 minutos, para a desnaturação do DNA plasmidial. A reação de sequenciamento foi processada em 10 µL contendo: 2 µL de *Big Dye Terminator*, 2 µL de Tampão de Sequenciamento (5X), 1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador a 10 pmol, 1 µL de água milli-Q autoclavada e 4 µL de amostra.

Inicialmente as amostras foram submetidas a uma desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto. Em seguida, a ciclagem compreendeu 25 ciclos de 15 segundos a 96°C, 15 segundos para anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores em temperatura de 50°C e 4 minutos a 60°C, para extensão das cadeias.

A precipitação dos produtos da reação de sequenciamento consistiu inicialmente, na adição de 2 µL EDTA 125 mM, 2 µL de acetato de sódio 3M e 50 µL de etanol 100%. Em seguida, uma breve agitação foi dada na placa e esta foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos ao abrigo da luz. Logo após, a placa foi centrifugada a 4.000 rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido por inversão e a placa centrifugada invertida por 1 minuto a 1.000 rpm. Em seguida, foram adicionados 70 µL de etanol 70% às amostras, que foram centrifugadas a 4.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Novamente o sobrenadante foi desprezado por inversão da placa e esta centrifugada invertida por 1 minuto a 1.000 rpm. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por aproximadamente 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 10 µL de formamida às amostras, que foram centrifugadas por 1 minuto a 1.000 rpm, desnaturadas a 95°C por 5 minutos e imediatamente transferidas para o gelo no qual foram mantidas por 2 minutos. As amostras foram sequenciadas em um sequenciador automático *ABI 3130 XL (Applied Biosystems Inc/Life Technologies, Foster City, CA, USA)*.

4.5. Análise das sequências

Para a análise das sequências, utilizou-se o programa computacional *BioEdit* (HALL, 1999), a fim de recortar a sequência de E6. Também foi utilizado o programa *Phred/Phap/consed* disponível no site <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>, a fim de verificar a qualidade das sequências obtidas (EWING et al., 1998). Além disso, as sequências

foram analisadas quanto às divergências nucleotídicas em relação às sequências protótipos dos HPVs 6 [HPV6a (L42216), HPV6b (X00203) e HPV6vc (AF092932)] e 11 (M14119). O alinhamento dessas sequências protótipos e das amostras em ambas as orientações foi realizado pelo programa CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994).

A fim de confirmar as alterações nucleotídicas obtidas nos clones das amostras, foi estabelecido um número de cinco clones idênticos de cada paciente.

4.6. Análise Estatística

O teste Kruskal-Wallis foi usado para identificar se havia associação significativa entre a presença de HPV e a carga viral de HIV, e entre a presença de HPV e a idade das pacientes. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Os testes de Pearson Chi-Square, Likelihood Ratio Chi-Square e Fisher's exact test, foram utilizados para identificar a associação da infecção por HPV com os fatores de risco (presença de HIV, consumo de álcool e tabaco). Os valores de $p < 0,05$ foram considerações estatisticamente significantes.

4.7. Análise Filogenética

A árvore filogenética foi reconstruída pelo método de Maximum Likelihood utilizando o programa *PhyML* através da plataforma ATGC – South of France Bioinformatics Laboratories (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) (GUINDON et al., 2010). O modelo de substituição foi calculado para cada tipo de HPV (6 e 11) utilizando o software *jModelTest* (POSADA, 2008). O cálculo de sustentação de ramo, *Bootstrap*, foi realizado com 1000 réplicas e valores acima de 70% foram considerados significantes.

5. Referências Bibliográficas

AKHAVIZADEGAN, H. Electrocautery Resection, Shaving with a Scalpel, and Podophyllin: a Combination Therapy for Giant Condyloma Acuminatum. **The World Journal of Men's Health**, v. 33, n. 1, p. 39, 2015. Disponível em:

<<http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.5534/wjmh.2015.33.1.39>>.

BARROSO, L. F. The role of Human Papilloma Virus (HPV) vaccination in the prevention of anal cancer in individuals with Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1) infection. **Therapeutic advances in vaccines**, v. 1, n. 2, p. 81–92, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3967665&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

BATISTA, M. V. A.; FERREIRA, T. A E.; FREITAS, A. C.; BALBINO, V. Q. An entropy-based approach for the identification of phylogenetically informative genomic regions of Papillomavirus. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 8, p. 2026–2033, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.09.013>>.

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. 70–79, 2010. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.002>>.

BOCCARDO, E.; LEPIQUE, A. P.; VILLA, L. L. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. **Carcinogenesis**, 2010.

BRAUN, S. A.; GERBER, P. A. Successful treatment of perianal condylomata acuminata with ingenol mebutate gel. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 14, n. 6, p. 616–617, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/ddg.12879>>.

CASTELLSAGUÉ, X.; AULT, K. A.; BOSCH, F. X.; et al. Human papillomavirus detection in cervical neoplasia attributed to 12 high-risk human papillomavirus genotypes by region. **J. Clin. Virol.**, v. 2, p. 61–69, 2016.

CHANSAENROJ, J.; THEAMBOONLERS, A.; JUNYANGDIKUL, P.; SUPIYAPHAN, P.; POOVORAWAN, Y. Whole genome analysis of human papillomavirus genotype 11 from cervix, larynx and lung. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, p. 2619–2623, 2012.

DANIELEWSKI, J. A.; GARLAND, S. M.; MCCLOSKEY, J.; HILLMAN, R. J.; TABRIZI, S. N. Human Papillomavirus Type 6 and 11 Genetic Variants Found in 71 Oral and Anogenital Epithelial Samples from Australia. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 1–9, 2013.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, n. SUPPL., p. 7–15, 2005.

DUNOWSKA, M.; MUNDAY, J. S.; LAURIE, R. E.; HILLS, S. F. K. Genomic characterisation of *Felis catus* papillomavirus 4, a novel papillomavirus detected in the oral cavity of a domestic cat. **Virus Genes**, v. 48, p. 111–119, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11262-013-1002-3>>. .

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome research**, p. 175–185, 1998. Disponível em: <<http://genome.cshlp.org/content/8/3/175.short>>. .

EZECHI, O.; OSTERGREN, P.; NWAOKORIE, F.; UJAH, I.; ODBERG PETTERSSON, K. The burden, distribution and risk factors for cervical oncogenic human papilloma virus infection in HIV positive Nigerian women. **Virology Journal**, v. 11, n. 1, p. 5, 2014. Disponível em: <<http://www.virologyj.com/content/11/1/5>>. .

FUESSEL, A. L.; HE, Q.; RADY, P. L.; et al. Nested PCR with the PGMY09 / 11 and GP5 + / 6 + primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. , v. 122, p. 87–93, 2004.

FUJINAGA, K.; KIVIAT, N.; KUYPERS, J.; et al. Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world . Variation of Human Papillomavirus Type 6 (HPV-6) and HPV-11 Genomes Sampled throughout the World. , v. 6, n. 7, p. 1746–1754,

1995.

GALL, T.; KIS, A.; TATA, T. Z.; et al. Genomic differences in the background of different severity in juvenile-onset respiratory papillomatosis associated with human papillomavirus type 11. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 202, p. 353–363, 2013.

GARLAND, S. M.; STEBEN, M.; SINGS, H. L.; et al. Natural history of genital warts: analysis of the placebo arm of 2 randomized phase III trials of a quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) vaccine. **The Journal of infectious diseases**, v. 199, n. 6, p. 805–814, 2009.

GENOVESE, N. J.; BROKER, T. R.; CHOW, L. T. Nonconserved lysine residues attenuate the biological function of the low-risk human papillomavirus E7 protein. **Journal of virology**, v. 85, n. 11, p. 5546–5554, 2011.

GONÇALVES, A. K.; COBUCCI, R. N.; RODRIGUES, H. M.; MELO, A. G. DE; GIRALDO, P. C. Safety, tolerability and side effects of human papillomavirus vaccines: a systematic quantitative review. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 651–659, 2014. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1413867014000695>>. .

GUINDON, S.; DUFAYARD, J.-F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum- Likelihoods Phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic biology**, v. 59, n. 3, p. 307–321, 2010.

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

<<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>>. .

HAZARD, K.; KARLSSON, A.; ANDERSSON, K.; et al. Cutaneous human papillomaviruses persist on healthy skin. **The Journal of investigative dermatology**, v. 127, n. August 2006, p. 116–119, 2007.

HEMPER, E.; WITTAU, M.; LEMKE, J.; KORNMAN, M.; HENNEBRUNS, D. Management of a giant perineal condylomata acuminata Case report. **GMS Interdisciplinary**, v. 5, p. 1–5, 2016.

HILLEMANN, P.; BREUGELMANS, J. G.; GIESEKING, F.; et al. Estimation of the incidence of genital warts and the cost of illness in Germany: a cross-sectional study. **BMC Infectious Diseases**, v. 8, p. 76, 2008. Disponível em:

<<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mnh&AN=18518976&site=ehost-live&scope=site>>. .

HOULIHAN, C. F.; LARKE, N. L.; WATSON-JONES, D.; et al. Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts HPV infection and increased risk of HIV acquisition . A systematic review and meta-analysis. , v. 26, n. 17, p. 1–18, 2013.

ILLIANO, E.; DEMURTAS, O. C.; MASSA, S.; et al. Production of functional, stable, unmutated recombinant human papillomavirus E6 oncoprotein: implications for HPV-tumor diagnosis and therapy. **Journal of translational medicine**, v. 14, n. 1, p. 224, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27465494>>. .

SERRANO, B.; et al. Potential impact of a 9-valent HPV vaccine in HPV-related cervical disease in 4 emerging countries (Brazil , Mexico , India and China). , v. 38, p. 748–756, 2014.

ISOLA, J.; DEVRIES, S.; CHU, L.; GHAZVINI, S.; WALDMAN, F. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. **The American journal of pathology**, v. 145, n. 6, p. 1301–8, 1994. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1887491&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

IZADI, F.; HAMKAR, R.; GHANBARI, H.; ABDOLMOTALLEBI, F. The role of Human papilloma virus (HPV) genotyping in recurrent respiratory papillomatosis in Rasoul Akram Hospital. , v. 26, n. 2, p. 90–93, 2012.

KJÆR, S. K.; TRAN, T. N.; SPAREN, P.; et al. The Burden of Genital

Warts : A Study of Nearly 70 , 000 Women from the General Female Population in the 4 Nordic Countries. , v. 196, 2007.

KNEPPER, B. R.; EKLUND, M. J. Malignant degeneration of pulmonary juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. , 2014.

KURY, C. M. H.; KURY, M. M. H.; SILVA, R. M. H.; et al. Trials in Vaccinology Implementation of the quadrivalent vaccine against HPV in the Municipality of Campos dos Goytacazes , Brazil – A combination of strategies to increase immunization coverage and early reduction of genital warts qq. , v. 2, p. 19–24, 2013.

LANGE, C. E.; TOBLER, K.; SCHRANER, E. M.; et al. Complete canine papillomavirus life cycle in pigmented lesions. **Veterinary Microbiology**, v. 162, n. 2-4, p. 388–395, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.10.012>>. .

LÉONARD, B.; KRIDELKA, F.; DELBECQUE, K.; et al. A clinical and pathological overview of vulvar condyloma acuminatum.pdf. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 480573, 2014.

MAKIYAMA, K.; HIRAI, R.; MATSUZAKI, H.; IKEDA, M. Assessment of Human Papilloma Virus Infection in Adult Laryngeal Papilloma Using a Screening Test. **Journal of Voice**, v. 27, n. 2, p. 230–235, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jvoice.2012.10.014>>. .

MAMMAS, I. N.; SPANDIDOS, D. A.; SOURVINOS, G. Genomic diversity of human papillomaviruses (HPV) and clinical implications: An overview in adulthood and childhood. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 220–226, 2014.

MARTINEZ-ZAPIEN, D.; RUIZ, F. X.; POIRSON, J. et al. Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53. **Nature**, v. 529, p. 541-545, 2016.

MATOS, R. P. A. DE; SICHERO, L.; MANSUR, I. M.; et al. Nucleotide and phylogenetic analysis of human papillomavirus types 6 and 11 isolated from recurrent respiratory papillomatosis in Brazil. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary**

genetics in infectious diseases, v. 16, p. 282–9, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23466889>>. .

MINOSSE, C.; GARBUGLIA, A. R.; LAPA, D.; et al. Genetic variability in E6, E7 and L1 protein of HPV81 from HIV-1 positive women in Italy. **New Microbiologica**, v. 33, n. 1, p. 25–35, 2010.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550–560, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrc2886>\n<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrc2886>>. .

MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; GONZÁLEZ, A. B. DE; GISSMANN, L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24, n. SUPPL. 3, p. 1–10, 2006.

NIAZY, F.; ROSTAMI, K.; MOTABAR, A. R. Giant Condyloma Acuminatum of Vulva Frustrating Treatment Challenge. **World journal of plastic surgery**, v. 4, n. 2, p. 159–62, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4537608&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

PANG, C. L.; THIERRY, F. Human papillomavirus proteins as prospective therapeutic targets. **Microbial Pathogenesis**, v. 58, p. 55–65, 2013.

PARK, I. U.; INTROCASO, C.; DUNNE, E. F. Human Papillomavirus and Genital Warts: A Review of the Evidence for the 2015 Centers for Disease Control and Prevention Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. Suppl 8, p. S849–S855, 2015.

PETRÁŠ, M. Impact of quadrivalent human papillomavirus vaccine in women at increased risk of genital warts burden : Population-based cross-sectional survey of Czech women aged 16 to 40 years. , v. 33, p. 6264–6267, 2015.

PIENTONG, C.; WONGWARISSARA, P.; EKALAKSANANAN, T.; et al. Association of human papillomavirus type 16 long control region mutation

and cervical cancer. **Virology journal**, v. 10, n. 1, p. 30, 2013. Virology Journal. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3599568&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

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. 471–493, 2010.

PINO, M. DEL; BLEEKER, M. C.; QUINT, W. G.; et al. Comprehensive analysis of human papillomavirus prevalence and the potential role of low-risk types in verrucous carcinoma. **Modern Pathology**, v. 25, n. 10, p. 1354–1363, 2012. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2012.91>>. .

POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 7, p. 1253–1256, 2008.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463–7, 1977. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=431765&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

SICHERO, L.; VILLA, L. L. Epidemiological and functional implications of molecular variants of human papillomavirus. , v. 39, p. 707–717, 2006.

STANLEY, M. Immune responses to human papillomavirus. **Vaccine**, v. 24, n. SUPPL. 1, p. 16–22, 2006.

STANLEY, M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. **Gynecologic Oncology**, v. 117, n. 2, p. S5–S10, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.01.024>>. .

STUREGÅRD, E.; JOHANSSON, H.; EKSTRÖM, J.; et al. Human papillomavirus typing in reporting of condyloma. **Sexually transmitted diseases**, v. 40, n. 2, p. 123–129, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23324975>>. .

SUTHIPINTAWONG, C.; SIRIAUNKGUL, S.; TUNGSINMUNKONG, K.; et al. Human papilloma virus prevalence, genotype distribution, and pattern of infection in thai women. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 12, p. 853–856, 2011.

SUZUKI, S.; SEKIZAWA, A.; TANAKA, M.; MATSUDA, H. Current Status of Condylomata Acuminata in Pregnant Japanese Women. , p. 347–349, 2016.

TAI, C.; TSOU, T.; HSIEH, W.; et al. Molecular detection and incidence of human papillomavirus in neonates: Methodology and a pilot study in a medical center. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 45, n. 3, p. 185–192, 2012. Elsevier Taiwan LLC. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2011.11.004>>. .

TAYLOR, S.; BUNGE, E.; BAKKER, M.; CASTELLSAGUE, X. The incidence, clearance and persistence of non-cervical human papillomavirus infections: a systematic review of the literature. **BMC infectious diseases**, v. 16, p. 293, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12879-016-1633-9>>. .

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673–4680, 1994.

TORRENTE, M. C.; RODRIGO, J. P.; HAIGENTZ, M.; et al. HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTIONS IN LARYNGEAL CANCER. , , n. April, p. 581–586, 2011.

VILLIERS, E. M. DE; FAUQUET, C.; BROKER, T. R.; BERNARD, H. U.; HAUSEN, H. ZUR. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, p. 17–27, 2004.

WALLACE, N. A.; GALLOWAY, D. A. Novel Functions of the Human Papillomavirus E6 Oncoproteins. **Annual Review of Virology**, v. 2, n. 1, p. 403–423, 2015. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-virology-100114-055021>>.

WANG, J. W.; RODEN, R. B. S. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 175–186, 2013. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.017>>. .

YANG, D. Y.; BRACKEN, K. Update on the new 9-valent vaccine for human papillomavirus prevention. **Canadian Family Physician**, v. 62, p. 399–402, 2016.

YANG, L.; ZHU, D.; DANG, Y.; ZHAO, X. Treatment of condyloma acuminata in pregnant women with cryotherapy combined with proanthocyanidins: Outcome and safety. **Experimental and Therapeutic Medicine**, p. 2391–2394, 2016. Disponível em: <<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2016.3207>>. .

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/>>. Acesso em 10 de fevereiro de 2017.

Capítulo II

Artigo Científico (Submetido na revista: *Infection, Genetics and Evolution*)

Title: Analysis of nucleotide alterations in Human Papillomavirus 6 and 11 E6 region in Condyloma Acuminatum samples

Authors: Marina Carrara Dias¹; Bruna Stuqui¹; Paola Jocelan Scarin Provazzi¹; Cíntia Bittar¹; Natália Maria Candido¹; Renata Prandini Adum de Matos¹; Rodolfo Miglioli Badial¹, Caroline Measso do Bonfim¹; Patricia Pereira dos Santos Melli²; Silvana Maria Quintana³; José Antônio Cordeiro⁴; Paula Rahal¹; Marília de Freitas Calmon^{1*}.

¹Institute of Biosciences, Letters and Exact Sciences of São Paulo State University– São José do Rio Preto– São Paulo - Brazil

²Clinical Hospital of Faculty of Medicine of Ribeirão Preto – São Paulo University– Ribeirão Preto – São Paulo – Brazil

³Faculty of Medicine of Ribeirão Preto – São Paulo University – Ribeirão Preto – São Paulo – Brazil

⁴Faculty of Medicine of Rio Preto – São José do Rio Preto – São Paulo – Brazil

* Corresponding author: Marília de Freitas Calmon

Institute of Biosciences, Letters and Exact Sciences of São Paulo State University

Cristóvão Colombo, No. 2265, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

Tel. +55 17 32212852; e-mail: macal131@gmail.com

Abstract

Condyloma acuminatum (CA) or genital warts are benign proliferative epidermal or mucous lesions that are caused by infection with human papillomavirus (HPV), mainly the low-risk types 6 and 11. The variants of HPVs are defined as viral sequences that share identity in the nucleotide sequence of the L1 gene greater than 98%. Based on this criterion, HPV6 and 11 variants lineages have been studied and there is still an attempt to correlate these genetic variants with different clinical findings of infection. In this way, the aim of this study was to detect variants and nucleotide alterations presents in HPV types 6 and 11 E6 found in condyloma acuminatum samples, to correlate the HPV presence with the clinical-pathological data of the patients and to determine phylogenetic relations with variants of others places of the world. The E6 region of 25 HPV6 samples and 7 HPV11 samples of condyloma were sequenced. Twelve samples were identified as the HPV6a variant, presenting the mutation G474A, and one of them also showed the mutation T369G. The other 13 patients were positive to HPV6vc without nucleotide alterations. In the analysis of the HPV11 samples, all patients showed the mutations T137C and C380T. Besides that, one patient also presents the nucleotide alteration T410C. None of the mutations found in the 32 analyzed samples showed amino acids changes. In the statistical analysis, it was observed a significant association between the HPV and HIV coinfection, and it was also found a significant association between HPV11 and alcohol consumption. Others data analyzed did not show significant association. In the phylogenetic analysis, it was not observed relation with the geographical region that they were isolated.

Keywords: Condyloma acuminatum, HPV6, HPV11, nucleotide alterations.

1. Introduction

Condyloma acuminatum (CA) or genital warts are benign proliferative epidermal or mucous lesions. Cases that the growth is more aggressive are more difficult to be treated with common therapies, for example laser therapy and topical cytotoxic agents (Akhavizadegan, 2015; Petrář, 2015). Condyloma is one of the most common sexually transmitted diseases and it is caused by the infection with human papillomavirus (HPV), mainly the low-risk types 6 and 11 (Garland et al., 2009; Léonard et al., 2014; Suzuki et al., 2016). However, the coinfection with high-risk HPV types also could happens (Garland et al., 2009; Léonard et al., 2014; Suzuki et al., 2016).

Mucosal human papillomaviruses are classified according to their oncogenic potential. They could be low-risk, for example types 6 and 11 that are present in genital and anal warts and recurrent respiratory papillomatosis, or high-risk, for example the genotypes 16 and 18, that are found in carcinomas (del Pino et al., 2012; Makiyama et al., 2013; Suthipintawong et al., 2011; Torrente et al., 2011). In lesions related to the HPV types 6 and 11 are more difficult to occur malignant transformation, while in the coinfections by the types 16 and 18, there are higher chance to develop anal or cervical cancer (Hemper et al., 2016).

The HPV infection could be associated to some risk factors like high number of sexual partners, early age at start of sexual activity, tobacco smoking, number of pregnancies, alcohol, and previous sexually transmitted diseases (Marcellusi et al., 2015).

The immune response has an important role in the elimination of many HPV infections. However, some infections could not be eliminated and persist for many years, being an additional risk factor for cancer development (Amador-Molina et al., 2013).

Women infected with the human immunodeficiency virus (HIV) are more susceptible to HPV infection. Deficiency in the immunity cells because the HIV infection results in the antibodies instability that should

combat high-risk human papillomavirus. This event facilitates the virus persistence and lesion progression (Barroso, 2013; Ezechi et al., 2014).

Tobacco smoking could modify systemic and local immunity by suppressing both cell-mediated and humoral immune responses (Tamer et al., 2016). Alcohol consumption also could change the inflammatory process and suppress immune response (Kumar et al., 2015). These events may lead to the increase of HPV infection and condyloma development (Tamer et al., 2016).

Human papillomavirus is a double strand DNA virus, composed to an icosahedral capsid of 52-55 nm and genome length of 8 kb (Dunowska et al., 2013). These viruses are classified in Papillomaviridae family, that are composed by a large genetic diversity (Bernard et al., 2010; Lange et al., 2013). Until the present, there are more than 200 HPV types identified and they are capable to infect the squamous epithelium of the skin or the genital and oral mucosa (Batista et al., 2011; Dunowska et al., 2013; Stanley, 2010).

The HPV genes E6 and E7 are responsible to the uncontrolled proliferation on the infected epithelium. Mutations in these regions may cause difference in the oncogenic potential of the virus (Mammas et al., 2014). This event could occur due to the different interaction of the virus with host cellular mechanisms that may modulate clinical course (Mammas et al., 2014). The analysis of the HPV diversity are important to future vaccines strategies and to estimate the vaccines success in immunocompromised individuals (Mammas et al., 2014).

In this way, the aims of the study were to detect variants and nucleotide alterations present in the region E6 of human papillomavirus types 6 and 11 found in condyloma acuminatum lesions, to correlate the HPV presence with the patient's clinical-pathological data and to determine phylogenetic relations between obtained HPV variants and the HPV variants of others regions of the world.

2. Methods

2.1. Clinical samples

Ethical permission was obtained from the Research Ethics Committee of the Institute of Biosciences, Letters and Exact Sciences of São Paulo State University, in the city of São José do Rio Preto, with the license number 1.529.236.

This study evaluated 25 samples that were positive to HPV6 and 7 HPV11 positive samples. The 32 samples were from biopsies obtained by surgical section of genital and anal lesions, as well as cytological smear samples, from patients attended at the Clinical Hospital of the University of São Paulo Medical School in Ribeirão Preto.

The DNA of these samples was extracted using the methodology of phenol chloroform (Isola et al., 1994) and the DNA integrity was evaluated by the β -globin gene amplification. The HPV genotyping was performed by sequencing with the primers PGM09/11 and GP5+/6+ (Fuessel et al., 2004).

2.2. E6 Amplification

To amplify the HPV E6 region present in the samples, it was used the polymerase chain reaction methodology. The reactions were processed using specific primers (HPV6: F: 5' GGGGGATCCGAATTCATGGAAAGTGCAAATGC 3' and R: 3' GTGAAGCTTGGATCCTAGGGTAACATGTCTTCC 5'; HPV11: F: 5' AAAATTAGCAGACGAGGCATT 3' and R: 3' CCACCTTGTCCACCTCATCT 5').

2.3. Cloning

In order to obtain more reliability of sequencing data, the amplified E6 of each patient was ligated to the pJET1.2/blunt cloning vector of the

Clone JET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) following the manufacturer's instructions. The cloned products were transformed into *Escherichia coli* chemically competent of lineage DH5 α Z, by thermal shock method. After transformation, bacteria were overspread in petri plates containing solid LB medium and 0.1 mg/mL of Ampicillin. Samples were incubated at 37°C for 16 hours. Subsequently, five colonies of each sample were selected and they were incubated into liquid LB medium with 0.1 mg/mL of Ampicillin at 37°C for 16 hours and 250 rpm. After bacterial growth, the plasmidial DNA was extracted using the *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas Life Sciences, Canada)*, following the manufacturer's instructions.

2.4. Nucleotide alterations detection

Purified products were sequenced by dideoxy-terminal fluorescent method using *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems/Life Technologies, Foster City, CA, USA)* (Sanger et al., 1977). Samples were sequenced in a 3130xl *Genetic Analyzer (Applied Biosystems)* with the cloning vector primers (F: 5' CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC 3' and R: 3' AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG 5').

2.5. Sequence analysis

The *BioEdit* computer program (Hall, 1999) was used to cut the E6 sequence for the alignment. The *Phred/Phap/consed* program, available in <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>, was also used to verify the sequences quality (Ewing et al., 1998). Furthermore, the sequences were analyzed for nucleotide divergences comparing to the prototype sequences of HPVs 6 (HPV6a, HPV6b and HPV6vc) and 11 (M14119). The CUSTAL W program was used to the alignment in both directions

(Thompson et al., 1994). It was established five identical clones of each patient to confirm the nucleotide alterations.

2.6. Statistical analysis

The Kruskal-Wallis test was used to identify if there were significant association between HPV presence and HIV viral load, and between HPV presence and patient's age. P-values <0.05 were considered as statistically significant.

The Pearson Chi-Square, Likelihood Ratio Chi-Square and Fisher's exact tests were employed to identify the association of the HPV infection with the risk factors (HIV presence, alcohol consumption and tobacco smoking). P-values <0.05 were considered as statistically significant.

2.7. Phylogenetic analysis

Phylogenetic trees were reconstructed by Maximum Likelihood method using the *PhyML* program through the ATGC platform - South of France Bioinformatics Laboratories (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) (Guindon et al., 2010). Substitution model was calculated to each HPV (6 and 11) type using *jModel Test* software (Posada, 2008). Branch support calculation, *Bootstrap*, was realized with 1000 replicas and values above 70% were significant.

3. Results

3.1. Casuistic

Thirty-two samples were used to the analysis of the study and the collected clinical-pathological data could be observed on Table 1. The mean age of patients was 31.77 years old. The local occurrence percentages of lesions in the analyzed patients were 46.9% in genital

region, 34.4% in anogenital region, 3.1% in cervix and 15.6% of samples showed lack of information.

The analysis using the Kruskal-Wallis test showed a significant association between HIV viral load and HPV infection ($p=0.016$). When we considered the age factor, 61.3% of patients showed age between 16 and 29 years and 38.7% were more than 30 years old. However, age of patients was not significantly associated with HPV presence ($p=0.17$).

Related to the risk factors, the human immunodeficiency virus (HIV) was found in 19.35% of patients and it was observed a significant association between HPV and HIV coinfection ($p=0.034$). A significant association was also found between HPV11 infection and a higher alcohol consumption ($p=0.05$). However, in the present study, there was no significant association between HPV presence and tobacco smoking ($p=0.30$).

3.2. Nucleotide alterations detection

After sequences analysis of the 25 HPV6 samples, it was observed that 12 (48%) samples were positive to HPV6a (L42216) variant and all of these samples presented the G474A mutation. Moreover, sample 16 showed one more nucleotide alteration in the position 369 of the genome, consisting of a change of T to G (Figure 1A). The other 13 (52%) HPV6 samples were positive to HPV6vc (AF092932) variant and they did not show additional nucleotide alterations.

The analysis of seven HPV11 samples showed that all patients presented the T137C and C380T mutations comparing to the prototype sequence M14119 in this study. Furthermore, the patient 8 also showed the nucleotide alteration T410C (Figure 1B). None of the mutations in the 32 analyzed samples presented amino acid change.

3.3. Phylogenetic analysis

Phylogenetic trees were reconstructed using the Jukes-Cantor (JC69) substitution model, using PhyML software.

3.3.1. HPV6

The HPV samples phylogenetic analysis were performed using the 25 E6 sequences of this study, 45 Slovenian E6 sequences (Kocjan et al., 2009) and 33 Australian E6 sequences (Danielewski et al., 2013).

The phylogenetic tree obtained from analysis divided in two main branches (Figure 2). One monophyletic branch grouped HPV6b prototype sequence and five isolates related with this variant. The other branch was divided in two: in one of them, could be observed the HPV6a sequences together with your reference sequence; and in the second branch could be observed the HPV6vc reference sequence and the same variant isolates. In this way, the sequences did not group according geographical regions where they were isolated.

3.3.2. HPV11

The HPV samples phylogenetic analysis were realized using the seven E6 sequences of this study, 11 Slovenian E6 sequences (Kocjan et al., 2009) and 10 Australian E6 sequences (Danielewski et al., 2013).

Phylogenetic tree segregated in two main branches, one of them covering the prototype sequence (M14119), the EU918768 variant and one Australian isolate (Figure 3). The other branch grouped sequences of this study and the Slovenian and Australian isolates. In this way, it was observed that sequences did not group according to the geographical region that they were isolated.

4. Discussion

The genetic variability study based in the E6 gene sequence of human papillomavirus is related to the possibility of mutation occurrence in critical regions to p53 proteins degradation and in the regions involved with host immune response (Chagas et al., 2011). The E6 gene is extremely important to the tumor formation, so nucleotide variations in this region could cause amino acid changes that are related to the different transformation risk and disease progression (Lavezzo et al., 2016).

In this study, it was observed 12 condyloma acuminatum samples positive to the HPV6a variant and all of them showed the nucleotide alteration in the 474 position of HPV genome. This mutation was also found in Australian anogenital samples (Danielewski et al., 2013) and Brazilian recurrent respiratory papillomatosis samples (Matos et al., 2013). Contrary to the nucleotide alteration in the position 369 of the virus genome observed in our study, this nucleotide change was not observed in both studies. Besides the nucleotides substitution in E6 sequence, amino acid changes were not observed in our study.

Although the difference between the variants has been small, the HPV6vc variant was more frequent in this study. This data corroborates the literature, once HPV6vc is the most common variant in recurrent respiratory papillomatosis and genital warts (Danielewski et al., 2013; Matos et al., 2013; Godínez et al., 2014). This variant was highly conserved in genital lesions analyzed in this study since it did not show any nucleotide alteration.

Condyloma acuminatum samples of this study that were HPV11 positive showed mutations in relation to the prototype sequence (M14119). The nucleotide alteration in the position 380 of the virus genome was also observed in anogenital samples and the other mutations in positions 137 and 410 were found in recurrent respiratory papillomatosis (Danielewski et al., 2013; Matos et al., 2013). However, none of these alterations results in amino acid change. The prevalence of HPV11 variants instead of

prototype sequence was also observed in other studies (Matos et al., 2013; Godínez et al., 2014). Specific lineages within the same HPV genotype could change the viral infection persistence and precursors lesions progression, and also could affect the viral assembly, immune response, pathogenicity and p53 degradation (Mosmann et al., 2015).

The HPV11 E6 and E7 proteins play an important role in productive life cycle facilitating episomal maintenance of viral genome and could act similar to high-risk HPV proteins (Kocjan et al., 2009). In this way, any nucleotide alteration in E6 sequence protein could change its function.

Risk factors for HPV infections could include genital contact, age, number of lifetime sexual partners, low socioeconomic status, previous sexually transmitted diseases, tobacco smoking and alcohol consumption (Tamer et al., 2016).

Evasion of the immune response to HPV is critical for a successful infection (Amador-Molina et al., 2013). Women infected with the human immunodeficiency virus (HIV) have a higher risk to facilitate HPV persistence and they have a reduced ability to control the oncogenic viral processes (Wang et al., 2017). These factors increase the chance of lesions development and could explain the significant association of HPV and HIV coinfection observed in the present study (Wang et al., 2017).

In the present study, 61.3 % of the patients were between 16 and 29 years old. The other patients were more than 30 years old. The lower occurrence of HPV in older women could be due the infection elimination and natural immunity. However, this decrease also could be related to the increase of safe sexual behavior of oldest women (Soohoo et al., 2013). The statistical analysis of the study showed no association between HPV persistence and patient's age. This result was also observed in cervical samples (Elmi et al., 2017).

Alcohol consumption and tobacco smoking are also risk factors to carcinogenic due their important roles in immune suppression, as observed in head and neck cancer development (Koshiol et al., 2006;

Kumar et al., 2015). This characteristic may result in an alteration of the inflammatory response to infection (Kumar et al., 2015). The modification of immune response could facilitate the HPV infection persistence and the lesions development caused by alcohol and tobacco consumption (Koshiol et al., 2006; Kumar et al., 2015).

In the present study, it was not observed a significant association between HPV presence and tobacco smoking. This result was also seen in oral mucosa samples that were HPV positive (Pattanshetty et al., 2016). However, HPV infected cells could be more susceptible to tobacco effects (Pattanshetty et al., 2016). This influence could be seen in head and neck cancer samples, where it was observed a significant association between the p53 overexpression and smoking (Jamaly and Khanehkenari, 2012).

The statistical analysis to observe the relationship of HPV infection and alcohol consumption showed a significant association between patients infected by HPV11 and a higher consumption of alcohol. The relationship between alcohol and HPV infection also could be seen in head and neck cancer samples (Kumar et al., 2015). In these lesions, the high-risk HPV persistence was observed to be significantly associated with alcohol consumption (Kumar et al., 2015). The lower consumption of alcohol and tobacco in women positive to high-risk HPV could reduce the risk of HPV persistence and the lesions progression to severe stages (Oh et al., 2014).

In the phylogenetic analysis, it was not possible to observe the genomic variants distribution according to the geographical region that the virus was isolated, as observed with HPVs 16 and 18. These two types of HPV had their origin and speciation in Africa and, then, spread and diversified through human migrations. In this way, the variants are different in several places (Ho et al., 1993; Ong et al., 1993). On the contrary of 16 and 18 genotypes, previous studies and this study observed that genomic diversity of HPV 6 and 11 isolated from several anatomical sites are not

correlated to the place that sample is isolated (Matos et al., 2013; Godínez et al., 2014; Heinzl et al., 1995; Kocjan et al., 2009).

Human papillomaviruses are conserved viruses, because they present mutation rate too low. This factor is probably due the HPV capacity to exploit the host replication machinery and change their activity to replicate their own genome (Lavezzo et al., 2016). The host machinery maintains a low rate of mutation. In this way, the HPV genetic variation could be resulted of nucleotide polymorphisms, insertions or deletions that become fixed over time (Harari et al., 2014). Due this characteristic, genetic diversity of these microorganisms may be the result of a long evolutionary history with genetic alterations accumulation over millions of years (Lavezzo et al., 2016).

Currently, it is still necessary more studies to analyze the influence of HPV intratypical genetic variants in the increased risk of carcinogenic development (Lavezzo et al., 2016). Data observed in the present study and in the literature, indicate that types and variants papillomavirus identification, and risk factors correlations could be useful to risk analysis and lesion management strategies.

5. Conclusion

In the present study, it was possible to observe 12 HPV6a variants and all of them presented G474A mutation. One HPV6a sample also showed the T369G mutation. The other HPV6 samples were diagnosed HPV6vc variant and they did not present nucleotide alteration. In all of the HPV11 samples were found T137C and C380T mutations and one of them also showed the T410C nucleotide alteration. In the statistical analysis, it was also found an association of HPV and HIV coinfection. No association was observed between HPV infection and the risk factors age and tobacco smoking. Related to the alcohol consumption, it was observed an association between HPV11 and a higher alcohol consumption. The

phylogenetic analysis showed no geographical association between variants of HPV6 or HPV11.

6. Acknowledgements

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – grant number [2015/06628-7](#)) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

7. References

- Akhavizadegan, H., 2015. Electrocautery Resection, Shaving with a Scalpel, and Podophyllin: a Combination Therapy for Giant Condyloma Acuminatum. *World J. Mens. Health* 33, 39. doi:10.5534/wjmh.2015.33.1.39
- Amador-Molina, A., Hernández-Valencia, J., Lamoyi, E., Contreras-Paredes, A., Lizano, M., 2013. Role of Innate Immunity against Human Papillomavirus (HPV) Infections and Effect of Adjuvants in Promoting Specific Immune Response. *Viruses* 5, 2624–2642. doi:10.3390/v5112624
- Barroso, L.F., 2013. The role of Human Papilloma Virus (HPV) vaccination in the prevention of anal cancer in individuals with Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1) infection. *Ther. Adv. vaccines* 1, 81–92. doi:10.1177/2051013613496946
- Batista, M.V. a, Ferreira, T. a E., Freitas, A.C., Balbino, V.Q., 2011. An entropy-based approach for the identification of phylogenetically informative genomic regions of Papillomavirus. *Infect. Genet. Evol.* 11, 2026–2033. doi:10.1016/j.meegid.2011.09.013
- Bernard, H.U., Burk, R.D., Chen, Z., van Doorslaer, K., Hausen, H. Zur, de Villiers, E.M., 2010. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401,

70–79. doi:10.1016/j.virol.2010.02.002

Chagas, B.S., Batista, M.V.A., Guimarães, V., Balbino, V.Q., Crovella, S., Freitas, A.C., 2011. New variants of E6 and E7 oncogenes of human papillomavirus type 31 identified in Northeastern Brazil. *Gynecol. Oncol.* 123, 284–288. doi:10.1016/j.ygyno.2011.07.008

Danielewski, J. a., Garland, S.M., McCloskey, J., Hillman, R.J., Tabrizi, S.N., 2013. Human Papillomavirus Type 6 and 11 Genetic Variants Found in 71 Oral and Anogenital Epithelial Samples from Australia. *PLoS One* 8, 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0063892

de Matos, R.P.A., Sichero, L., Mansur, I.M., do Bonfim, C.M., Bittar, C., Nogueira, R.L., Küpper, D.S., Valera, F.C.P., Nogueira, M.L., Villa, L.L., Calmon, M.F., Rahal, P., 2013. Nucleotide and phylogenetic analysis of human papillomavirus types 6 and 11 isolated from recurrent respiratory papillomatosis in Brazil. *Infect. Genet. Evol.* 16, 282–289. doi:10.1016/j.meegid.2012.12.033

del Pino, M., Bleeker, M.C., Quint, W.G., Snijders, P.J., Meijer, C.J., Steenbergen, R.D., 2012. Comprehensive analysis of human papillomavirus prevalence and the potential role of low-risk types in verrucous carcinoma. *Mod. Pathol.* 25, 1354–1363. doi:10.1038/modpathol.2012.91

Dunowska, M., Munday, J.S., Laurie, R.E., Hills, S.F.K., 2013. Genomic characterisation of *Felis catus* papillomavirus 4, a novel papillomavirus detected in the oral cavity of a domestic cat. *Virus Genes* 48, 111–119. doi:10.1007/s11262-013-1002-3

Elmi, A.A., Bansal, D., Acharya, A., Skariah, S., Dargham, S.R., Abu-Raddad, L.J., Mohamed-Nady, N., Amuna, P., Al-Thani, A.A.J., Sultan, A.A., 2017. Human Papillomavirus (HPV) Infection: Molecular Epidemiology, Genotyping, Seroprevalence and Associated Risk Factors among Arab Women in Qatar. *PLoS One* 12, e0169197. doi:10.1371/journal.pone.0169197

Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M., Green, P., 1998. Base-calling of

- automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 175–185. doi:10.1101/gr.8.3.175
- Ezechi, O., Ostergren, P., Nwaokorie, F., Ujah, I., Odberg Pettersson, K., 2014. The burden, distribution and risk factors for cervical oncogenic human papilloma virus infection in HIV positive Nigerian women. *Virol. J.* 11, 5. doi:10.1186/1743-422X-11-5
- Fuessel, A.L., He, Q., Rady, P.L., Zhang, L., Grady, J., Hughes, T.K., Stisser, K., Konig, R., Tying, S.K., 2004. Nested PCR with the PGMY09 / 11 and GP5 + / 6 + primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples 122, 87–93. doi:10.1016/j.jviromet.2004.08.007
- Garland, S.M., Steben, M., Sings, H.L., James, M., Lu, S., Railkar, R., Barr, E., Haupt, R.M., Joura, E. a, 2009. Natural history of genital warts: analysis of the placebo arm of 2 randomized phase III trials of a quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) vaccine. *J. Infect. Dis.* 199, 805–814. doi:10.1086/597071
- Godínez, J.M., Nicolás-Párraga, S., Pimenoff, V.N., Mengual-Chuliá, B., Muñoz, N., Bosch, F.X., Sánchez, G.I., McCloskey, J., Bravo, I.G., 2014. Phylogenetically related, clinically different: Human papillomaviruses 6 and 11 variants distribution in genital warts and in laryngeal papillomatosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 20. doi:10.1111/1469-0691.12420
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., 2010. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum- Likelihoods Phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59, 307–321.
- Hall, T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* doi:citeulike-article-id:691774
- Harari, A., Chen, Z., Burk, R.D., Health, P., 2014. HPV Genomics: Past, Present and Future. *Curr Probl Dermatol* 45, 1–18.

doi:10.1159/000355952.HPV

- Heinzel, P.A., Chan, S.Y., Ho, L., O'Connor, M., Balaram, P., Campo, M.S., Fujinaga, K., Kiviat, N., Kuypers, J., Pfister, H., Steinberg, B.M., Tay, S.K., Villa, L.L., Bernard, H.U., 1995. Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1746–1754.
- Hemper, E., Wittau, M., Lemke, J., Kornmann, M., Henne-Bruns, D., 2016. Management of a giant perineal condylomata acuminata Case report. *GMS Interdiscip.* 5, 1–5.
- Ho, L., Chan, S.Y., Burk, R.D., Das, B.C., Fujinaga, K., Icenogle, J.P., Kahn, T., Kiviat, N., Lancaster, W., Mavromara-Nazos, P., 1993. 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.* 67, 6413–6423.
- Isola, J., DeVries, S., Chu, L., Ghazvini, S., Waldman, F., 1994. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am. J. Pathol.* 145, 1301–8.
- Jamaly, S., Khanekhenari, M.R., 2012. Relationship between p53 overexpression , human papillomavirus infection , and lifestyle in Indian patients with head and neck cancers 543–550. doi:10.1007/s13277-011-0295-x
- Kocjan, B.J., Poljak, M., Cimerman, M., Gale, N., Potočnik, M., Bogovac, Ž., Seme, K., 2009. Prevaccination genomic diversity of human papillomavirus genotype 6 (HPV 6). *Virology* 391, 274–283. doi:10.1016/j.virol.2009.06.030
- Koshiol, J., Schroeder, J., Jamieson, D.J., Marshall, S.W., Duerr, A., Heilig, C.M., Shah, K. V, Klein, R.S., Cu-uvin, S., Schuman, P., Celentano, D., Smith, J.S., 2006. Original Contribution Smoking and Time to Clearance of Human Papillomavirus Infection in HIV-Seropositive and HIV-Seronegative Women 164, 176–183.

doi:10.1093/aje/kwj165

- Kumar, R., Rai, A.K., Das, D., Das, R., Kumar, R.S., 2015. Alcohol and Tobacco Increases Risk of High Risk HPV Infection in Head and Neck Cancer Patients: Study from North-East Region of 16, 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0140700
- Lange, C.E., Tobler, K., Schraner, E.M., Vetsch, E., Fischer, N.M., Ackermann, M., Favrot, C., 2013. Complete canine papillomavirus life cycle in pigmented lesions. *Vet. Microbiol.* 162, 388–395. doi:10.1016/j.vetmic.2012.10.012
- Lavezzo, E., Masi, G., Toppo, S., Franchin, E., Gazzola, V., Sinigaglia, A., Masiero, S., Trevisan, M., Pagni, S., Palù, G., Barzon, L., 2016. Characterization of intra-type variants of oncogenic human papillomaviruses by next-generation deep sequencing of the E6/E7 region. *Viruses* 8. doi:10.3390/v8030079
- Léonard, B., Kridelka, F., Delbecque, K., Goffin, F., Demoulin, S., Doyen, J., Delvenne, P., 2014. A clinical and pathological overview of vulvar condyloma acuminatum.pdf. *Biomed Res. Int.* 2014, 480573.
- Makiyama, K., Hirai, R., Matsuzaki, H., Ikeda, M., 2013. Assessment of Human Papilloma Virus Infection in Adult Laryngeal Papilloma Using a Screening Test. *J. Voice* 27, 230–235. doi:10.1016/j.jvoice.2012.10.014
- Mammas, I.N., Spandidos, D.A., Sourvinos, G., 2014. Genomic diversity of human papillomaviruses (HPV) and clinical implications: An overview in adulthood and childhood. *Infect. Genet. Evol.* 21, 220–226. doi:10.1016/j.meegid.2013.11.002
- Marcellusi, A., Capone, A., Favato, G., Mennini, F.S., Baio, G., Haeussler, K., Bononi, M., Italian, H.P. V, Study, C., 2015. Health Utilities Lost and Risk Factors Associated With HPV-induced Diseases in Men and Women : The HPV Italian Collaborative Study Group 37.
- Mosmann, J.P., Monetti, M.S., Frutos, M.C., Kiguen, A.X., Venezuela, R.F., Cuffini, C.G., 2015. Mutation detection of E6 and LCR genes

- from HPV 16 associated with carcinogenesis. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 16, 1151–1157. doi:10.7314/APJCP.2015.16.3.1151
- Oh, H.Y., Seo, S., Kim, M.K., Lee, D.O., Chung, Y.K., Lim, C., Kim, J., Lee, C.W., Park, S., 2014. Synergistic Effect of Viral Load and Alcohol Consumption on the Risk of Persistent High-Risk Human Papillomavirus Infection 9. doi:10.1371/journal.pone.0104374
- Ong, C.K., Chan, S.Y., Campo, M.S., Fujinaga, K., Mavromara-Nazos, P., Labropoulou, V., Pfister, H., Tay, S.K., ter Meulen, J., Villa, L.L., 1993. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J. Virol.* 67, 6424–6431.
- Pattanshetty, S., Kotrashetti, V.S., Nayak, R., Bhat, K., Somannavar, P., Babji, D., 2016. PCR based detection of HPV 16 and 18 genotypes in normal oral mucosa of tobacco users and non- users PCR based detection of HPV 16 and 18 genotypes in normal oral mucosa of tobacco users and non-users 0295. doi:10.3109/10520295.2014.887143
- Petrá, M., 2015. Impact of quadrivalent human papillomavirus vaccine in women at increased risk of genital warts burden : Population-based cross-sectional survey of Czech women aged 16 to 40 years 33, 6264–6267.
- Posada, D., 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1253–1256. doi:10.1093/molbev/msn083
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, a R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463–7. doi:10.1073/pnas.74.12.5463
- Soohoo, M., Blas, M., Byraiah, G., Carcamo, C., Brown, B., 2013. Cervical HPV Infection in Female Sex Workers: A Global Perspective. *Open AIDS J.* 7, 58–66. doi:10.2174/1874613601307010058
- Stanley, M., 2010. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol. Oncol.* doi:10.1016/j.ygyno.2010.01.024

- Suthipintawong, C., Siriaunkgul, S., Tungsinmunkong, K., Pientong, C., Ekalaksananan, T., Karalak, A., Kleebkaow, P., Vinyuvat, S., Triratanachai, S., Khunamornpong, S., Chongsuwanich, T., 2011. Human papilloma virus prevalence, genotype distribution, and pattern of infection in Thai women. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 12, 853–856.
- Suzuki, S., Sekizawa, A., Tanaka, M., Matsuda, H., 2016. Current Status of Condylomata Acuminata in Pregnant Japanese Women 347–349. doi:10.7883/yoken.JJID.2015.561
- Tamer, E., Cakmak, S.K., Ilhan, M.N., Artuz, F., 2016. Demographic characteristics and risk factors in Turkish patients with anogenital warts. *J Infect Public Heal.* 9, 661–666. doi:10.1016/j.jiph.2015.12.009
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Torrente, M.C., Rodrigo, J.P., Haigentz, M., Dikkers, F.G., Rinaldo, A., Eng, F., Glasg, F., Takes, R.P., Olofsson, J., Ferlito, A., Eng, F., 2011. HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTIONS IN LARYNGEAL CANCER 581–586. doi:10.1002/hed
- Wang, C.J., Sparano, J., Palefsky, J.M., 2017. Human Immunodeficiency Virus / AIDS , Human Papillomavirus , and Anal Cancer 26, 17–31.

Table 1. Characterization of the 32 samples regarding to Age, Lesion, HIV coinfection, Alcohol consumption and tobacco smoking (“-”: lack of information; “Neg”: Negative; “Pos”: Positive).

Sample	Age (Years)	Condyloma	HIV	Alcohol consumption	Tobacco smoking
1	51	-	Neg	-	No
2	26	Anogenital	Neg	No	No
3	42	-	Neg	No	Yes
4	49	Genital	Pos	Yes	Yes
5	22	Genital	Neg	-	No
6	50	Anogenital	Neg	No	Yes
7	20	Anogenital	Neg	Yes	No
8	39	Genital	Neg	No	No
9	37	Anogenital	Neg	No	No
10	24	-	Neg	-	-
11	26	Cervical	Pos	Yes	Yes
12	42	Genital	Neg	No	No
13	78	-	Neg	No	No
14	21	Genital	Neg	No	No
15	21	Genital	Neg	No	No
16	45	Genital	Pos	No	Yes
17	29	Genital	Pos	-	Yes
18	29	Genital	Pos	-	Yes
19	-	-	Pos	-	-
20	39	Anogenital	Pos	-	-
21	22	Anogenital	Neg	-	
22	16	Genital	Neg	No	No
23	23	Genital	Neg	No	Yes
24	21	Genital	Neg	-	-
25	53	Anogenital	Neg	-	Yes
26	24	Anogenital	Neg	-	-
27	21	Genital	Neg	No	No
28	33	Genital	Neg		-
29	19	Genital	Neg	No	No
30	19	Anogenital	Neg	No	No
31	27	Anogenital	Neg	-	-
32	17	Anogenital	Neg	No	No

A

HPV6 samples		Nucleotide positions		Number of samples
		3	4	
		6	7	
		9	4	
6a	Ref. 6a	T	G	
	3, 5, 6, 12, 14, 19, 20, 23, 24, 26, 27		A	11
	16	G	A	1
6vc	Ref. 6vc	T	A	
	2, 7, 9, 10, 13, 15, 22, 25, 28, 29, 30, 31, 32			13

B

HPV11 samples		Nucleotide samples			Number of samples
		1	3	4	
		3	8	1	
		7	0	0	
Ref. M14119		T	C	T	
1, 4, 11, 17, 21, 18		C	T		6
8		C	T	C	1

Figure 1. Nucleotide alterations in E6 gene of HPV6 (A) and HPV11 (B) isolates. In the superior part of figure are indicated genomic positions and the mutations are vertically indicated. In gray, conserved nucleotides in relation to prototype sequence. In the column “samples number” is indicated the number of patients that the isolates are identical to the specified variants.

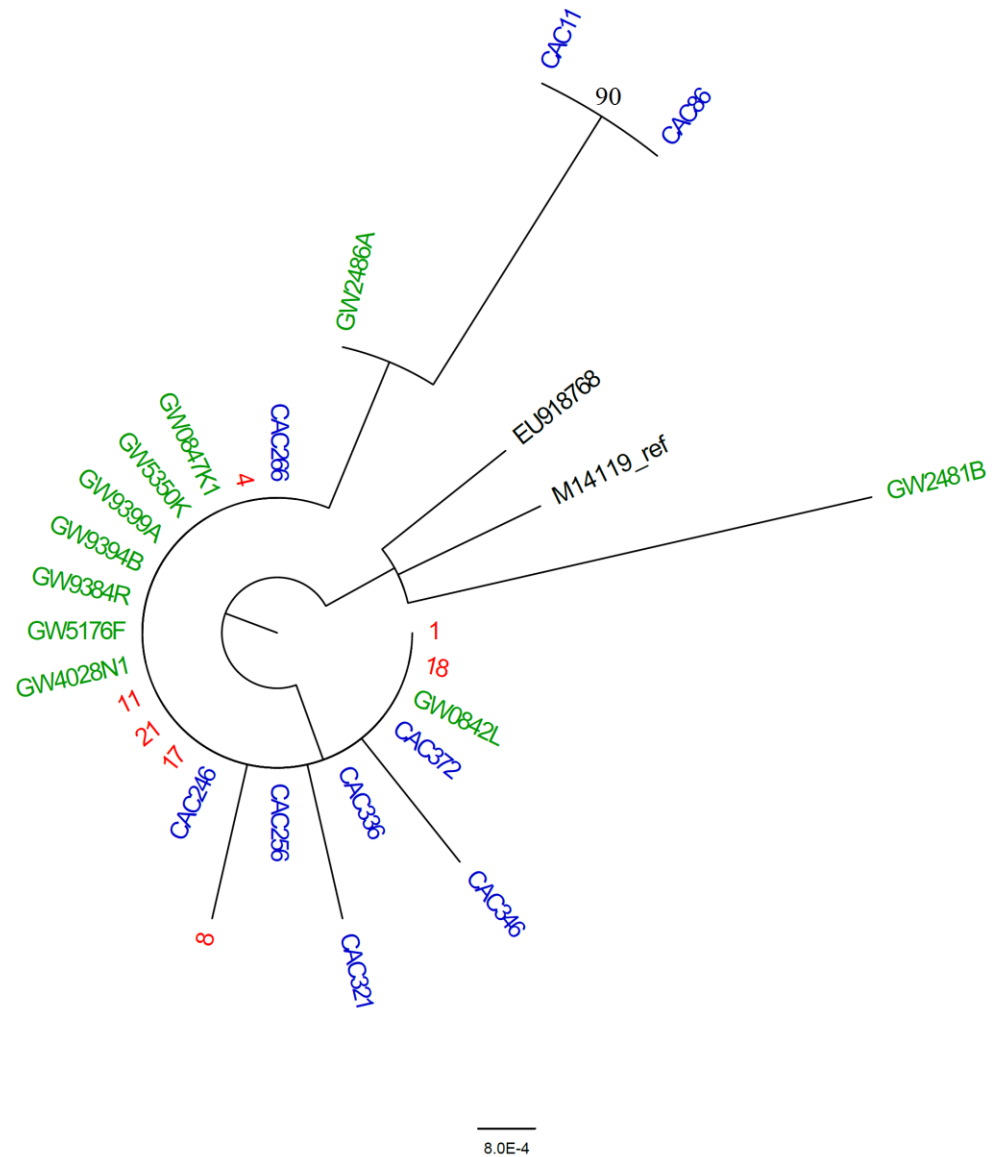


Figure 3. Unrooted phylogenetic tree of HPV11 variants of condyloma acuminatum or genital warts samples from Brazil (red), Slovenia (blue), Australia (green) and reference sequences (black). The tree was reconstructed by the Maximum Likelihood method, using JC60 model. Bootstrap was performed with 1,000 replicates. Values above 70% were considered significant.

Capítulo III

1. Conclusões

- No grupo amostral utilizado, foram observadas 12 variantes HPV6a e 13 variantes HPV6vc;
- As amostras HPV11 não se mostraram idênticas à sequência protótipo e a variante do banco de dados;
- Entre as amostras positivas para HPV6a, todas apresentaram a mutação G474A, sendo que uma das amostras apresentou a mutação T369G a mais no genoma;
- As pacientes HPV6vc não apresentaram alterações nucleotídicas;
- As amostras HPV11 apresentaram as alterações nucleotídicas T137C e C380T. Além disso, uma paciente mostrou a mutação T410C a mais;
- Foi observada associação entre a presença de HPV e a coinfeção por HIV;
- No grupo amostral do estudo, foi observada associação entre o consumo de bebida alcoólica e a presença de HPV11;
- Não houve associação entre a presença de HPV e os fatores de risco consumo de tabaco e idade;
- As amostras de condiloma positivas para HPV6 e 11 não agruparam de acordo com a região geográfica nas quais foram isoladas.