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

Rodolfo Miglioli Badial

Detecção e genotipagem de Papilomavírus Humano (HPV) e sua relação com a ocorrência de lesões cervicais em mulheres coinfectadas com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

São José do Rio Preto
2017

Rodolfo Miglioli Badial

Detecção e genotipagem de Papilomavírus Humano (HPV) e sua relação com a ocorrência de lesões cervicais em mulheres coinfectadas com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

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

Orientadora: Profª. Drª. Paula Rahal

Coorientadora: Drª Paola J. Scarin Provazzi

São José do Rio Preto
2017

Badial, Rodolfo Miglioli.
Detecção e genotipagem de papilomavírus humano (HPV) e sua relação com a ocorrência de lesões cervicais em mulheres coinfectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) / Rodolfo Miglioli Badial. -- São José do Rio Preto, 2017
67 f.: il., tabs.

Orientador: Paula Rahal
Coorientador: Paola J. Scarin Provazzi
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Virologia médica. 2. Vírus do papiloma. 3. Papillomaviridae. 4. Infecções por HIV. 5. Doenças do vírus papiloma - Aspectos genéticos. 6. Lesões cervicais - Aspectos genéticos. 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

Rodolfo Miglioli Badial

Detecção e genotipagem de Papilomavírus Humano (HPV) e sua relação com a ocorrência de lesões cervicais em mulheres coinfectadas com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

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.

Comissão Examinadora

Profª. Drª. Paula Rahal
UNESP - São José do Rio Preto
Orientadora

Profª. Drª. Carolina Colombelli Pacca
FACERES - São José do Rio Preto

Profª. Drª. Tatiana Rabachini
Universidade de Berna - Suiça

São José do Rio Preto
07 de março de 2017

“Não é o que você faz, mas quanto amor você dedica no que faz que realmente importa.”
Madre Teresa de Calcutá

Aos meus pais, Julio Cesar e Maria José e ao meu irmão Mateus, por me apoiarem, acreditarem sempre em mim e por estarem sempre ao meu lado e também a todos que de alguma forma contribuíram para essa realização.

AGRADECIMENTOS

À minha Orientadora Profª Drª Paula Rahal, pela oportunidade, pela sua assistência e conhecimento, pelo seu apoio, dedicação e amizade.

À minha Coorientadora Drª Paola Jocelan Scarin Provazzi, pela dedicação, pela sua ajuda em todos os momentos, pelo conhecimento e aprendizagem transmitidos, pelo seu apoio, preocupação e amizade.

A todos os colegas do Laboratório de Estudos Genômicos Ana Claudia, Bruna, Carina, Caroline, Cíntia, Francielly, Guilherme, Lenira, Maria Letícia, Marcos, Mariana, Marilia, Marina, Natalia, Paola, Rafael, Renata e Tairine, pela convivência diária, apoio, ajuda e amizade.

A toda minha família, de modo especial aos meus pais Julio Cesar Badial e Maria José Miglioli Badial e irmão Mateus Miglioli Badial, por todo amor, carinho, paciência, compreensão, preocupação e apoio.

A todos os colegas da faculdade e da turma 55, de modo especial Cecília Banho, Felipe do Amaral, Felipe Dorigão, Luis Perissini, Mariana Thereza, Marina Biaso, Marina de Paula, Marina Dias, Náthali Machado, Natália Angelotti, Mayara Gimenes, Renan Garcia, Renato Ferreira, Vanessa Cardoso e Vanessa Urbinatti, pela amizade, convivência, ajuda e apoio durante os anos de faculdade.

Aos meus amigos de longa data, Ariano, Carlos, Bruno Cunha, Bruno Perissotti, Fernando, Gabriel, Henrique, Isabella Nascimbeni, Isabela Pinotti,

Milton, Thiago e Vitória, pela amizade de tantos anos, pelo apoio e preocupação.

A CAPES, FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro para a realização deste projeto.

À banca examinadora, Drª Carolina Colombelli Pacca e Drª Tatiana Rabachini por terem disponibilizado o seu tempo e contribuirerm na finalização deste trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

À UNESP-IBILCE, pela oportunidade e aprendizado.

À Deus, pelo dom da vida e por tudo que alcancei até hoje, Ele está do inicio ao fim em tudo que faço.

Sumário

Capítulo I 15

1. INTRODUÇÃO 16

1.1 Papilomavírus Humano. 16

1.2 Transmissão. 21

1.3 Modificações para Câncer e Lesões. 22

1.4 Tratamento e Vacinas. 24

1.5 Coinfecção com Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). 26

2. JUSTIFICATIVA 27

3. OBJETIVO 28

3.1 Objetivo Geral 28

3.2 Objetivos Específicos 28

4. MATERIAL E MÉTODOS 29

4.1 Aspectos Éticos 29

4.2 Casuística. 29

4.3 Obtenção do Material 30

4.4 Extração de DNA 30

4.5 Nested - Reacão em Cadeia da Polimerase (NESTED - PCR) 31

4.6 Purificação dos Produtos de PCR 33

4.7 Sequenciamento 34

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 35

Capítulo II 44

Artigo Científico (Submetido na revista: The Scientific World Journal) 45

ABSTRACT 47

Introduction 48

Methods 49

Results 51

Discussion 55

Conclusion 57

References 58

Capítulo III 65

Conclusão Geral 66

Anexos 67

Lista de Siglas e Abreviaturas

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (*Acquired immunodeficiency syndrome*)

CC – Carcinoma cervical (*Cervical carcinoma*)

DNA – Ácido desoxirribonucléico (*deoxyribonucleic acid*)

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human immunofeficiency virus*)

HPV – Pailomavírus Humano (*Human Papillomavirus*)

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

LIE – Lesão Intraepitelial Escamosa (*Squamous Intraepithelial Lesion*)

NIC – Neoplasia Intraepitelial Cervical (*Cervical Intraepithelial Neoplasia*)

nm – Nanômetro

pb – pares de base

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

pRb – Proteína do Retinoblastoma (*Retinoblastoma protein*)

TAR – Terapia Antiretroviral (*Antiretroviral Therapy*)

TARAA – Terapia Antiretroviral Altamente Ativa (*Highly Active Antiretroviral Therapy*)

RESUMO

Os papilomavírus são vírus de DNA circular fita dupla com diâmetro de aproximadamente 55 nm e forma icosaédrica. São não envelopados e podem induzir tumores epiteliais escamosos em diferentes localizações anatômicas. Eles pertencem à família Papillomaviridae e possuem um genoma de cerca de oito mil pares de bases, protegidos por proteínas do capsídeo. Mais de 200 tipos diferentes de papilomavírus humano (HPV) foram identificados e classificados em dois grupos distintos, alto risco e baixo risco, dependendo de sua associação com o desenvolvimento de câncer. A integração genômica do HPV é um mecanismo de infecção viral persistente, que eventualmente se desenvolve na fase de cancerização. Trata-se de um processo tipicamente aleatório, e pode ocorrer em qualquer local no DNA da célula hospedeira. Em alguns casos, a integração pode contribuir para o desenvolvimento do carcinoma cervical, que é precedido por lesões precursoras como neoplasia intraepitelial cervical ou lesões intraepiteliais escamosas. As infecções crônicas pelo HPV podem ser facilitadas pela coinfecção com o HIV, o que reduz a probabilidade de eliminação espontânea do HPV. Com base nisso, foi investigada a presença do HPV, bem como o seu genótipo em 80 amostras, coletadas em dois anos diferentes, de 40 pacientes coinfectadas com HIV. Como resultado, foi observada a presença do HPV em 59 amostras (73,75%) na qual, os tipos de alto risco foram predominantemente detectados (59,3%). Os tipos mais frequentes foram HPV56 (17%) seguido pelo HPV16 (15,3%). Os resultados foram correlacionados com os fatores de risco associados a coinfecção HPV/HIV apresentados pelas pacientes. Nesta análise, a carga viral do HIV foi associada à ocorrência de lesões cervicais (p=0,045). Desta forma, pode-se concluir que a maior frequência do HPV56 e HPV16 evidencia a

importância de incluir o tipo 56 nas vacinas HPV uma vez que o monitoramento das pacientes infectadas pelo HPV56 poderia contribuir para um melhor prognóstico para a infecção pelo HPV. A associação entre a carga viral do HIV e as lesões confirma a importância de monitorizar as doentes coinfectadas com HIV/HPV com carga viral elevada de HIV.

Palavras-chave: *HPV, lesões cervicais, coinfecção HIV.*

ABSTRACT

Papillomaviruses are circular double-stranded DNA viruses with a size of about 55 nm and icosahedral form. They are non-enveloped and may induce squamous epithelial tumors in different anatomical locations. They belong to the family Papillomaviridae and have a genome of about eight thousand base pairs, protected by capsid proteins. More than 200 different types of human papillomavirus (HPV) have been identified and classified into two distinct groups, high risk and low risk, depending on their association with the development of cancer. The genomic integration of HPV is a mechanism of persistent viral infection, which eventually develops in the cancerization phase. It is a typically random process, and can occur anywhere in the DNA of the host cell. In some cases, the integration may contribute to the development of cervical carcinoma, which is preceded by precursor lesions such as cervical intraepithelial neoplasia or squamous intraepithelial lesions. Chronic HPV infections can be facilitated by HIV coinfection, which reduces the likelihood of spontaneous HPV elimination. Based on this, we investigated the presence of HPV and its genotype in 80 samples collected in two different years from 40 patients coinfected with HIV. As a result, it was observed the presence of HPV in 59 samples (73.75%) in which the high risk types were predominantly detected (59.3%). The most frequent types were HPV56 (17%) followed by HPV16 (15.3%). The results were correlated with the risk factors associated with HPV/HIV coinfection presented by the patients. In this analysis, HIV viral load was associated with the occurrence of cervical lesions (p=0.045). Thus, it can be concluded that the higher frequency of HPV56 and HPV16 highlights the importance of including type 56 in HPV vaccines since the monitoring of patients infected with HPV56 could contribute to a better prognosis for HPV

infection. The association between HIV viral load and lesions confirms the importance of monitoring HIV/HPV coinfected patients with high HIV viral load.

Keywords: *HPV, cervical lesions, coinfection HIV.*

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO
1.1 Papilomavírus Humano.

Os papilomavírus são um grande grupo de pequenos vírus de DNA com tamanho aproximado de 55nm (VIETÍA et al., 2014) e forma icosaédrica (HAHNE et al., 2014), também são não envelopados e podem induzir tumores epiteliais escamosos (verrugas e papilomas) em muitas localizações anatômicas diferentes (MORSHED et al., 2014).

O papilomavírus humano (HPV) pertence à família Papilomaviridae e tem um genoma de DNA de cadeia dupla, protegido por proteínas do capsídeo (ALEMI; MOHABATKAR, 2014). Mais de 200 tipos virais diferentes foram identificados e classificados em dois grupos distintos, alto risco e baixo risco, dependendo da sua associação com o desenvolvimento do câncer (ALEMI; MOHABATKAR, 2014; ZHOU et al., 2014; PARIS et al., 2015); sendo os tipos que causam lesões cervicais de baixo grau e verrugas anogenitais considerados de baixo risco, e os tipos que causam lesões cervicais de grau moderado e alto, além de cânceres cervicais, considerados de alto risco (LU et al., 2015).

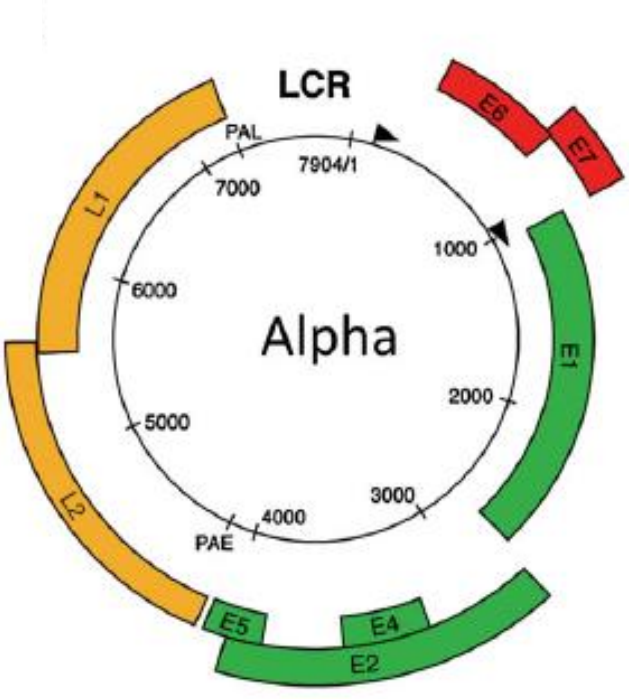
Os tipos de HPV de alto risco mais comuns são 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68. Os tipos 16 e 18 causam aproximadamente 70% dos casos de câncer cervical (MELONI et al., 2014). Os tipos de HPV de baixo risco são 6, 11, 40, 42, 43, 44 54, 61, 70, 72 e 81 e infectam o epitélio anogenital e podem causar lesões de baixo grau, como condilomas e lesões cervicais benignas e raramente são detectados em neoplasias malignas (HAEDICKE; IFTNER, 2013; RIZZO et al., 2014).

Um novo tipo de papilomavírus é reconhecido se o seu genoma completo for clonado e a sequência da região L1 do seu DNA (região mais conservada dentro do genoma do HPV) for diferente em mais de 10% do tipo de HPV mais próximo conhecido. Diferenças entre 2% e 10% definem um subtipo e diferenças menores do que 1% definem uma variante (MORSHED et al., 2014; KUKIMOTO; MURAMATSU, 2015). As variantes do HPV podem influenciar a persistência viral e o desenvolvimento de câncer cervical

(KABEKKODU et al., 2015), e do ponto de vista clínico, variantes HPV16 podem estar associadas com o desenvolvimento de lesões cervicais em mulheres, podendo estar relacionada a um potencial patogênico diferente (INÉS et al., 2015).

Os HPVs têm um genoma circular de oito mil pares de bases que pode ser dividido em regiões precoces e tardias. A região precoce é composta principalmente por genes que codificam as proteínas que atuam na replicação viral (E1, E2), transcrição (E2) e na modulação de funções celulares (E4, E5, E6, E7). A região tardia codifica duas proteínas de capsídeo, L1 e L2. Estas duas regiões são conectadas pela região de controle longo (LCR), que atua como a origem de replicação viral e contém elementos para a regulação da transcrição e manutenção do genoma do HPV como pode ser obeservado na **figura 1** (TOOTS et al., 2014).

Figura 1 - Representação esquematica do genoma do Papilomavírus Humano (HPV), evidênciando a região regulatória (LCR), as regiões precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e as regiões tardias (L1 e L2). (DOOBAR, J. et al., 2015).



O capsídeo do HPV é composto por duas proteínas estruturais, uma proteína menor do capsídeo em grande parte interna (L2) e uma proteína principal do capsídeo (L1). A proteína L1 é um alvo importante do sistema imune (EKALAKSANANAN et al., 2014), sendo o principal componente estrutural do virion do HPV além de poder formar capsômeros espontaneamente (MURATA et al., 2009).

A proteína E1 é necessária para a replicação do DNA viral. Atua como um agente repressivo da transcrição mantendo o número de cópias virais no interior da célula infectada (MORSHED et al., 2014).

A proteína E2 desempenha um papel importante na transformação de células, iniciando e inibindo a apoptose (MORSHED et al., 2014). Também pode atuar na regulação da transcrição e no caso do HPV16, dependendo do seu nível e o tipo de célula, pode aumentar ou diminuir a transcrição. Além disso, E2 se liga em locais alvo durante o inicio da replicação do DNA viral e por meio de interação com proteínas do hospedeiro, recruta E1, que em seguida interage com a DNA-polimerase celular e inicia a replicação do genoma viral (GAUSON et al., 2014).

Um outro papel da proteína E2 no ciclo de vida do HPV é atuar como o receptor mitótico para o genoma viral. Esta proteína E2 interage com o genoma do hospedeiro, unindo o material genético de ambos durante a mitose e assegurando que o genoma viral segregue para ambos os núcleos das células filhas durante a divisão celular (GAUSON et al., 2014).

A proteína E4 é citoplasmática e por vezes detectada no núcleo da célula, podendo estar envolvida na regulação do ciclo celular e auxiliar na amplificação do genoma viral, onde nessa fase é visível durante os estágios avançados da infecção (SIKORSK M., 1998). Esta proteína também tem papel no desenvolvimento da doença cervical devido à sua presença em lesões. Proteínas E4 de vários papilomavírus têm estrutura identificável mesmo entre a diversidade dos tipos de HPV (MORSHED et al., 2014).

A proteína E5 pode estar envolvida nas fases iniciais da transformação celular por meio da alteração da via de fator de crescimento, assim como do

aumento dos níveis de receptores do fator de crescimento epidérmico na superfície celular (RODRÍGUEZ et al., 2000). Além disso, E5 induz ativamente o escape imunológico, favorecendo a persistência da infecção (TAYLOR et al., 2015).

As proteínas E6 e E7 desempenham um papel central na transformação maligna HPV-dependente e são expressas no câncer cervical (MORSHED et al., 2014; ROOS et al., 2015), bem como têm como alvo proteínas supressoras de tumor, tais como p53 e pRB, para induzir a proliferação celular, antiapoptose, instabilidade do genoma e escapar do sistema imune inato (LIN et al., 2014; HALEC et al., 2014; AJIRO & ZHENG, 2015). A proteína E6 se liga à proteína p53, levando à sua degradação. Anteriormente, contudo, E6 se liga a uma proteína acessório (AP), e a combinação de E6 + E6(AP) provoca a proteólise de p53 e a eliminação de todas as suas funções conhecidas (**Figura 2**). Isto pode resultar em uma replicação descontrolada do HPV16 e/ou 18 em células infectadas (RESZEć et al., 2003). A proteína E7 se liga e inativa a proteína retinoblastoma (pRb), levando a sua degradação, o que resulta na perda da célula do controle sobre o ciclo celular (**Figura 3**). As oncoproteínas E6 e E7 podem ser submetidas a fosforilação para se ligarem as proteínas alvo (MORSHED et al., 2014).

Frente a uma infecção pelo HPV, as proteínas E6 e E7 influenciam diretamente a expressão e as funções dos interferons (IFNs) para prevenir a ação do sistema imunológico do hospedeiro. Recentemente, verificou-se que E6 de HPV alto risco desempenha um papel potencial na repressão da transcrição constitutiva do IFN-ƙ. O IFN-ƙ não apenas regula os componentes da via do IFN, mas também mantém a expressão dos receptores de reconhecimento de patógenos como TLR3, (GRABOWSKA & RIEMER, 2012).

A interrupção do processamento e apresentação de antígenos mediada pelo HPV inclui a diminuição da expressão das subunidades LMP2 e LMP7 do proteassoma, diminuição da expressão das subunidades transportadoras (TAP1 e TAP2) e diminuição da expressão do próprio MHC-I. Verificou-se que a proteína E7 de HPV de alto risco reprime o promotor do gene da cadeia

pesada do MHC de classe I. Além disso, E7 possui a capacidade de reprimir o promotor que regula a expressão tanto de LMP2 como de TAP1. A expressão reduzida destes componentes da maquinaria de processamento de antígenos pode causar um prejuízo na produção dos epitopos do HPV, conduzindo assim a um escapa imunológico (GRABOWSKA & RIEMER, 2012).

Ambas as funções das proteínas E6 e E7 aumentam as possibilidades de transmissão por meio do aumento da duração da infecção e pelo aumento da quantidade de vírus transmitidos por contato em hospedeiros suscetíveis. No entanto, verificou-se que estas oncoproteínas não são expressas em níveis elevados durante infecções agudas, uma vez que, a proteína viral precoce E2 suprime a expressão destas (MURALL; BAUCH; DAY, 2014).

Figura 2 - Proteína E6 de HPV leva a degradação de p53. (ALENCAR, T. R. 2009).

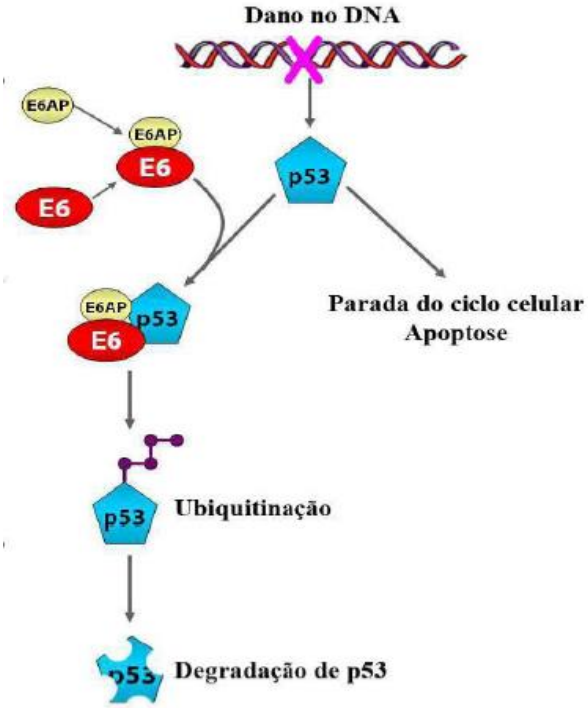
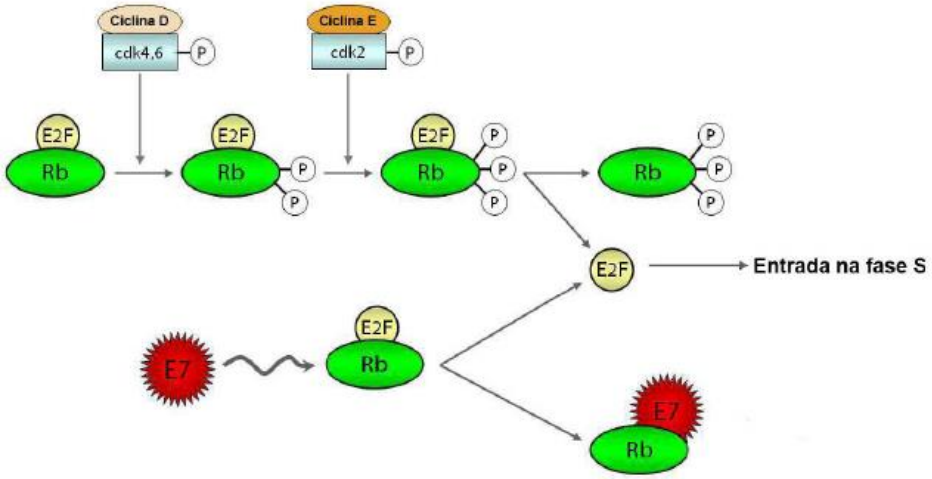


Figura 3 - Proteína E7 de HPV associada com a proteína do retinoblastoma (pRb). Aproteína E7 se liga a pRb, essa ligação desfaz o complexo entre pRb e o fator de trascrição celular E2F, resultando na liberação desse fator, fazendo a célula entrar na fase S do ciclo celular. (ALENCAR, T. R. 2009).



1.2 Transmissão.

As dinâmicas de transmissão do HPV são dependentes dos fatores virais e do hospedeiro, definidos por susceptibilidade, taxa de contato por unidade de tempo, probabilidade de transmissão e duração da infecciosidade (GIULIANO et al., 2014).

Devido ao fato do vírus ser epiteliotrófico, uma infecção só é possível por meio dos tecidos epitelial e escamoso. A forma mais importante de transmissão viral do HPV genital é a relação sexual. A transmissão é rápida, onde mais de 50% das mulheres jovens adquirem a infecção por HPV nos dois primeiros anos ao se tornarem sexualmente ativas. Cerca de 70-80% das mulheres terão uma infecção por HPV durante a sua vida. No entanto, a maioria das infecções por HPV são transitórias e não levam ao câncer, e quando levam demoram anos para desenvolve-lo e é precedida de infecção persistente com genótipos HPV de alto risco (CALLEGARI et al., 2014).

A transmissão vertical de mãe para filho no momento do parto é uma outra potencial via de contaminação. Isso explica porque o DNA do HPV é detectado em crianças (RYNDOCK; MEYERS, 2014; CHAN et al., 2014).

1.3 Modificações para Câncer e Lesões.

A integração genômica do HPV é uma forma de infecção viral persistente, sendo que o HPV integrado pode persistir por muito mais tempo do que o HPV não integrado. Além disso, têm sido relatado que a taxa de infecção integrada atingiu entre 90% a 100% no epitélio cervical HPV-positivo, o que eventualmente, se desenvolve na fase de cancerização (ZHANG et al., 2014).

O papel da integração do HPV no mecanismo de persistência da infecção pode ser atribuído, em maior grau, ao fato das células hospedeiras perderem a capacidade de identificar o DNA patogênico integrado ao seu próprio, não o eliminando. No entanto, a integração viral prejudica a estabilidade genômica das células hospedeiras. Anormalidades cromossômicas são frequentemente encontradas em locais de inserção do vírus, e os oncogenes vizinhos ou genes supressores de tumor poderiam, assim, ser ativados ou reprimidos (ZHANG et al., 2014).

A integração do DNA do HPV no cromossomo da célula hospedeira pode facilitar a expressão desregulada dos oncogenes virais E6 e E7. Trata-se de um processo tipicamente aleatório, e pode ocorrer em qualquer local no DNA da célula hospedeira, com diferentes níveis de interrupção para a expressão de genes virais (DOORBAR, 2007). A integração do HPV é favorecida em locais comuns e frágeis dentro do genoma do hospedeiro chamados "*hot spots*", que estão inseridos em genes e já foram descritos, como *HMGA2*, *DLG2, SEMA3D*, *POU5F1B, KLF5–KLF12, FHIT, HMGA2, LRP1B* e *SEMA3D* (HU et al., 2015). Em alguns casos, o padrão de expressão de genes celulares perto do local de integração pode contribuir para o desenvolvimento do câncer cervical (DOORBAR, 2007).

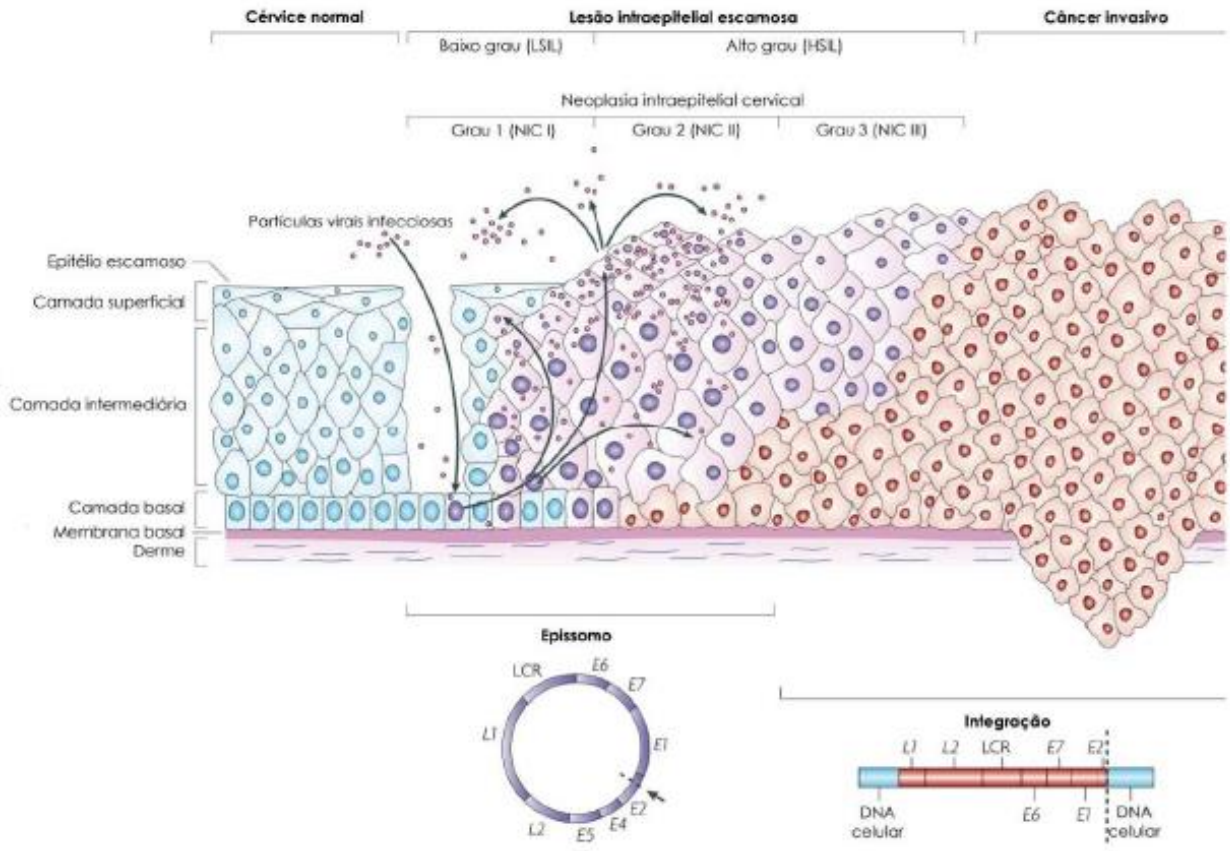
A patogênese do carcinoma cervical (CC) começa como um processo lento, que interrompe a diferenciação normal do epitélio cervical escamoso,

produzindo assim alterações na sua estrutura e fisiologia. Inicialmente se apresenta por meio de lesões precursoras que evoluem de forma lenta e progressiva, o que pode, em seguida, avançar para estágios leves, moderados e graves de displasia. O CC pode evoluir para câncer *in situ*, que é limitado à superfície do epitélio, e/ou para câncer invasivo, caso em que o envolvimento ultrapassa a membrana basal. Portanto, um dos fatores característicos do CC são suas fases clínicas definidas, as quais estão associados com as diferentes fases evolutivas que levam ao desenvolvimento da carcinogênese (SAAVEDRA et al., 2012).

O carcinoma cervical invasivo é precedido por lesões precursoras, que são caracterizadas por distúrbios de maturação celular, estratificação, e núcleo atípico e podem ser classificadas histologicamente como neoplasia intraepitelial cervical (NIC) ou citologicamente como lesões intraepiteliais escamosas (LIE) (**Figura 4**). Devido a esta fase pré-maligna bem definida, o câncer cervical é particularmente passível de triagem. O método de rastreio clássico baseia-se na avaliação citológica de Papanicolaou (BOULET et al., 2008).

A NIC foi classificada em três graus pela Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo grau 1, displasia leve (NIC I); grau 2, displasia moderada (NIC II); e grau 3, displasia severa com carcinoma in situ (NIC III). NIC I é equivalente a baixo grau da classe de LIE, enquanto NIC II e NIC III são equivalentes aos de alto grau de LIE (**Figura 4**). As pacientes com NIC I devem ser acompanhadas sem tratamento porque a maioria dos casos de NIC I regridem espontaneamente. Já mulheres com NIC II/III recomenda-se que devem ser submetidas a um tratamento excisional (ALSHENAWY, 2014).

Figura 4 – Representação esquemática da infecção do tecido epitelial pelo Papilomavírus Humano (HPV), bem como a evolução deste para possíveis lesões pré-cancerosas e câncer cervical invasivo. (Modificado de WOODMAN, C. B. J. et al., 2007).



1.4 Tratamento e Vacinas.

O padrão atual de cuidados para o câncer cervical avançado inclui a utilização do fármaco quimioterapêutico, cisplatina, em conjunto com a radioterapia. Em muitos casos, estes tratamentos são responsáveis por efeitos adversos significativos. Apesar das melhorias verificadas com a terapia combinada, a sobrevida de cinco anos para a maioria dos pacientes afetados por câncer de colo do útero avançado, é de aproximadamente 30%. Além disso, os tratamentos estão associados com taxas de recorrências significativas de até 10% dos casos (KNOFF et al., 2014).

A eficácia dos tratamentos cirúrgicos existentes podem cair devido ao risco de recaída, possivel remossão insuficiente do tecido afetado e efeitos colaterais potencialmente indesejáveis. Além disso, embora a administração de vacinas preventivas contra o HPV serem eficazes na prevenção do câncer cervical, elas não têm efeitos terapêuticos contra lesões pré-cancerosas ou cancerosas preexistentes (KNOFF et al., 2014), espera-se que estas vacinas, se combinadas com programas de triagem existentes possam tornar-se um componente crítico dos programas de prevenção de câncer cervical (GOMEZ et al., 2014).

A vacina quadrivalente de HPV recombinante possui a capacidade de prevenir a infecção contra HPV 16 e 18, bem como para HPV 6 e 11, e dirige-se para utilização em mulheres entre 9-26 anos de idade. Tem sido comercializada como tendo a capacidade de prevenir verrugas genitais, bem como o câncer de colo de útero, quando administrado em três doses de vacina, nos meses 0, 1 a 2, e 6 (GARLAND et al., 2007). Essa vacina também tem a capacidade de transmitir a protecção contra câncer vaginal e vulvar e neoplasia intraepitelial. A outra vacina é bivalente contra HPV 16 e 18, e indicada para uso em mulheres com idades entre 10 a 25 anos, quando administrada em três doses também nos meses 0, 1 a 2, e 6. Essa vacina é eficaz contra as verrugas anogenitais causadas por HPV, lesões pré-cancerosas e câncer cervical (MCGRAW, 2014).

As vacinas preventicas contra o HPV, citadas anteriomente, têm mostrado prevenir a infecção genital por HPV e reduzir suas incidências relacionadas a alto grau de NIC (HARPER et al., 2006). No entanto, provavelmente, pouco efeito será notado entre as pacientes que já foram infectadas pelo HPV antes da vacinação (KAWANA et al., 2009). As limitações de vacinas profiláticas contra o HPV demonstram uma necessidade urgente para novas abordagens, possivelmente mediadas pelo sistema imune, para erradicar a neoplasia associada ao HPV (KAWANA et al., 2014).

Uma vacina nonovalente de HPV foi licenciada em 2014 nos Estados Unidos e em 2015 no Canadá, União Européia e Australia, para prevenção do

câncer cervical, vulvar, vaginal e anal, suas respectivas lesões pré-cancerosas e verrugas genitais, causadas pelos tipos de HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58 em mulheres e homens com idade entre 9 a 26 anos (CASTELLSAGUÉ et al., 2016).

1.5 Coinfecção com Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).

Um dos tipos mais estudados de imunossupressão é a que ocorre devido ao vírus da imunodeficiência humana (HIV). Essa infecção leva a alterações na imunidade mediada por células, facilitando assim a aquisição de infecções oportunistas e limitando a capacidade de um organismo para produzir uma resposta imune eficiente (CAMARGO et al., 2014).

A infecção pelo HIV leva a um declínio tanto no número quanto na função das células T CD4+ (LIMA et al., 2014). Esta deficiência no sistema imune do indivíduo infectado o coloca em risco de outras infecções. A imunodeficiência aumenta a persistência do HPV aumentando assim o risco de anormalidades da citologia cervical e câncer cervical invasivo (DAMES et al., 2014). Infecções crônicas por HPV, que são muitas vezes caracterizadas por uma elevada carga viral do HPV, podem ser facilitadas pela coinfecção com o HIV, que reduz a probabilidade de eliminação espontânea do HPV (BERE et al., 2013).

Mulheres portadoras do HIV têm um maior risco para neoplasia intraepitelial cervical grau 2 ou 3 (NIC II/III). A doença residual ou recorrente após tratamento de NIC II/III também é mais frequente entre as mulheres HIV-positivas do que as mulheres HIV-negativas (VUYST et al., 2014). Essas mulheres também são mais propensas a terem infecções persistentes com genótipos de HPV alto risco. Devido a este aumento de risco, as diretrizes de triagem do câncer de colo de útero diferem para mulheres infectadas pelo HIV e não infectados pelo HIV (ADLER et al., 2014).

O advento da terapia anti-retroviral (TAR) para o tratamento de HIV/AIDS tem aumentado significativamente a expectativa de vida de mulheres infectadas pelo HIV, mas aumentou o risco de um prolongado período de

persistência da infecção pelo HPV, e, consequentemente, o aumento do risco de progressão para pré-câncer e câncer cervical (ZHANG et al., 2014).

Pessoas HIV-positivas tratadas com a terapia anti-retroviral altamente ativa (TARAA) tem reconstituição do sistema imunológico após uma bem sucedida redução da carga viral do HIV e um aumento na contagem de células T CD4+.

Neste contexto, o presente estudo visa melhorar o conhecimento sobre a patogênese da doença cervical assim como, contribuir para o estabelecimento de terapias mais adequadas para infecções e lesões causadas pelo HPV em pacientes com coinfecção com o HIV.

2. JUSTIFICATIVA

O carcinoma cervical é o sétimo câncer mais comum no mundo. Sabe-se que cerca de 291 milhões de mulheres no mundo apresentam o papilomavírus humano (HPV), sendo responsável por 15% de todos os cânceres que representam 274 mil mortes por ano (ROSALES et al., 2014).

Os tipos de HPV de alto risco, como o HPV16, podem transformar diretamente epitélios de mucosa e são considerados importantes agentes etiológicos de cânceres cervicais, anal e de orofaringe. Mais de 99% dos cânceres cervicais contém genomas de HPV e transcrições de HPV expressas (CHEN et al., 2014).

A distribuição dos tipos de HPV de alto risco em lesões intraepiteliais escamosas (LIE) de alto grau e carcinoma cervical invasivo (ICC) mostra pouca variação entre as regiões do mundo, sendo assim, é essencial o perfeito conhecimento desses tipos de HPV de alto risco para a introdução de um programa de vacinação eficaz e um melhor acompanhamento da ecologia viral antes e após a vacinação. Esta informação também é necessária para avaliar o benefício da vacina na prevenção do câncer cervical na população (BOUMBA et al., 2014).

Testes de detecção de DNA do HPV podem ser implementados como uma ferramenta auxiliar, em combinação com a citologia cervical, para

melhorar a gestão de pacientes com risco de doença cervical (MUNRO et al., 2015). A genotipagem do HPV é outro importante teste que pode contribuir para a prevenção do câncer cervical invasivo (ADLER et al., 2014) e é essencial para o melhor conhecimento dos tipos de HPV de alto risco para a introdução de um programa de imunização eficaz.

Mulheres positivas para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) estão em alto risco de infecção com HPV e, consequentemente, de desenvolver lesões intraepiteliais no utero. Além disso, a soropositividade pelo HIV também é considerada um fator de risco para o câncer cervical. O número de pacientes HIV positivas que irão chegar à idade em que o câncer cervical é mais comum está crescendo, e assim, o acompanhamento do impacto a longo prazo da coinfecção HPV com HIV é muito importante (FREGA et al., 2006).

Dessa forma é importante à detecção dos tipos de HPV em amostras cervicais presentes em pacientes com coinfecção HIV, bem como a sua genotipagem, observando a prevalência dos genótipos de HPV baixo risco e HPV alto risco e quais os que ocorrem com maior frequência e que podem estar relacionadas com a ocorrência das possíveis lesões. Esses fatores são importantes no tratamento destas lesões, a fim de impedir que progridam para o câncer cervical, o qual torna o tratamento mais difícil.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente estudo foi detectar a presença do Papilomavírus Humano (HPV), identificar os tipos virais e analisar os fatores de risco associados a coinfecção HPV/HIV em mulheres portadoras do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).

3.2 Objetivos Específicos

● Avaliar a presença de HPV a partir de amostras de *swab* cervical de mulheres infectadas com o vírus HIV;

● Identificar os tipos de HPVs presentes em amostras de *swab* cervical de mulheres infectadas com o vírus HIV;

● Correlacionar à presença de HPVs e seus genótipos com os dados clínico-patológicos das pacientes;

● Avaliar a associação entre os fatores de risco da coinfecção HPV/HIV com a possível ocorrência de lesões cervicais apresentadas pelas pacientes avaliadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pela comissão de pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas (HCFMRP/ USP), projeto 233, aprovado em 15 de novembro de 2009. Todas as pacientes foram convidadas a participar, receberam informação clara e objetiva sobre o protocolo de pesquisa a ser executado e assinaram o consentimento livre e esclarecido.

4.2 Casuística.

Foram avaliadas 80 amostras de *swab* cervical de 40 pacientes do sexo feminino com diagnóstico de infecção pelo vírus HIV. As amostras foram colhidas previamente no intervalo de um ano nos períodos de 2010 a 2011 e de 2011 a 2012 na qual foram realizados os procedimentos de colpocitologia, colposcopia e eventualmente, biópsia dirigida. Os dados clínico-patológicos das pacientes participantes do estudo estavam contidos nos prontuários médicos

do Ambulatório de Moléstias Infectocontagiosas em Ginecologia e Obstetrícia (AMIGO) e foram consultados para análise dos resultados.

4.3 Obtenção do Material

O material foi colhido com o auxílio de uma escova endocervical e colocado em um microtubo de 1,5 mL contendo 900µL de solução fisiológica 0,9%. Após identificação adequada, as amostras foram estocadas a -150ºC até processamento posterior.

4.4 Extração de DNA

O DNA das amostras foi extraído utilizando-se Fenol Clorofórmio. Inicialmente, foram adicionados 200µL de Solução TEP (Proteinase K 1 mg/mL; SDS 1%, Tris HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0) em 200µL de amostra. Em seguida, a mistura foi mantida sob agitação a 37ºC *overnight* seguindo-se incubação a 56ºC por uma hora. Na sequencia, foram adicionados 200µL de solução contendo fenol:clorofórmio:alcool isoamílico [25:24:1] a 4ºC, seguindo de homogeneização por um minuto e centrifugação por cinco minutos, à 12.000 rpm, em temperatura ambiente. Em seguida, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo contendo 200µL de solução contendo clorofórmio:álcool isoamílico [na proporção 24:1] a -20ºC seguindo homogeneização por um minuto. Posteriormente, o material foi centrifugado por cinco minutos, à 12.000 rpm, e a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo.

Para a precipitação e lavagem do DNA, foram adicionados 500µL de etanol 100% e 20µL de acetato de amônio 3M e os microtubos foram incubados por duas horas a -80ºC. Em seguida, os microtubos foram centrifugados por vinte minutos à 12.000 rpm a 4ºC com posterior descarte da fase aquosa. Ao precipitado foram adicionados 500µL de etanol 75% a -20ºC seguindo centrifugação por dez minutos à 12.000 rpm a 4ºC e descarte da fase aquosa. Os microtubos foram mantidos a 65ºC por vinte minutos. Para eluíção do DNA, aos microtubos foram adicionados 60µL de H_2O milli-Q a 65ºC. As amostras foram estocadas a -20°C.

4.5 Nested - Reacão em Cadeia da Polimerase (NESTED - PCR)

A metodologia de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para amplificar o DNA do papilomavírus humano presente nas amostras de *swab* cervicais, a fim de obter DNA suficiente para o sequenciamento e genotipagem dos tipos de HPV presentes. As reações foram processadas em duas etapas de amplificação. Na primeira reação, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores PGMy09 (5-CGT CCM ARR GGA WAC TGATC-3) e PGMy11 (5-GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3), que por serem degenerados detectam a sequência do DNA viral mesmo com as diferenças nas sequências dos diferentes tipos de HPV. O volume final das reações com My09 e My11 foi de 25µL, contendo Tampão 1x, dNTP mix (2mM), MgCl2 (4mM), oligonucleotídeos iniciadores (0,4pmol), *Taq DNA Polymerase* (*Fermentas Molecular Biology Tools/Thermo Scientific*, Pittsburgh PA, USA)

(2,5U/µL) e 100 ng das amostras de *swab* cervicais. Em todas as reações, um dos tubos não recebeu DNA, sendo o controle negativo da reação, e outro tubo recebeu DNA de linhagem celular (CaSki) a qual é positiva para HPV, sendo o controle positivo da reação. As reações compreenderam a um passo inicial de nove minutos a 95°C para a ativação da enzima, seguido de 40 ciclos de amplificação: um minuto a 95°C, um minuto a 55°C, para o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores e um minuto a 72°C. Após os 40 ciclos, seguiu-se um passo final de cinco 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 450pb. Os produtos de amplificação foram submetidos ao NESTED-PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores GP5+ (5-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3) e GP6+ (5-CTTATACTAAATGTCAAATAAAAA-3), que amplificam uma seqüência de 150pb interna ao fragmento produzido pelo par de oligonucleotídeos PGMy09/My11. As reações foram processadas em 50µL, contendo Tampão 1X, dNTP mix (0,08mM), MgCl2 (2,5mM), oligonucleotídeo iniciador GP5+ e GP6+ (0,5pmol), *Taq DNA Polymerase* (*Fermentas Molecular Biology Tools/Thermo Scientific*, Pittsburgh PA, USA) (5U/µL) e 5µL do produto de amplificação da reação com PGMy09 e PGMy11. Em todas as reações, um dos tubos não recebeu DNA, sendo o controle negativo da reação, e outro tubo recebeu o produto de PCR da reação de PGMy09 e PGMy11 com a linhagem (CaSki), sendo o controle positivo da reação. As reações compreenderam um

passo inicial de nove minutos a 95°C para a ativação da enzima, seguido de 40 ciclos de amplificação: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 45°C, para o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores e 30 segundos a 72°C. Após os 40 ciclos, seguiu-se um passo final de oito minutos a 72°C, para a extensão dos fragmentos. Os produtos das amplificações foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose 1% para a visualização das bandas, com tamanho correspondente a 150pb.

4.6 Purificação dos Produtos de PCR

Os produtos de amplificação foram purificados utilizando o kit de purificação Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (*GE Healthcare/Life Sciences*, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, aos produtos de reação foram adicionados inicialmente 500µL do reagente *Capture buffer type 3*. Posteriormente, essa mistura foi transferida para a coluna de purificação, sendo submetida à centrifugação a 16000 x g por 30 segundos. Na sequência, foram adicionados 500µL do reagente *Wash buffer type 1* à coluna, seguindo-se centrifugação a 16000 x g por 30 segundos. Para eluição, foram adicionados 25µL de água mili-Q autoclava à coluna, seguido de incubação a temperatura ambiente por um minuto e centrifugação a 16000 x g por um minuto. Os produtos de amplificação purificados foram estocados a -20°C.

4.7 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado segundo a técnica de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), utilizando-se o Kit *Big Dye terminator* (*Applied Biosystems*/*Life Technologies*, Foster City, CA, USA). A reação de sequenciamento foi processada em 10,0μL contendo: 2,0 μL de *Big Dye Terminator*, 2,0μL de Tampão de Sequenciamento (5X), 1μL de cada oligonucleotídeo iniciador a 10pmol (GP5+ e GP6+) e 5,0 μL de amostra. Inicialmente as amostras foram submetidas a uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos. Em seguida, a ciclagem compreendereu 25 ciclos de 20 segundos a 95ºC, 20 segundos para anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores em temperatura de 50ºC e 1 minuto a 60ºC, para extensão das cadeias.

A precipitação dos produtos da reação de sequenciamento consistiu inicialmente, na adição de 2,0μL EDTA 125 mM, 2,0μL de acetato de sódio 3M e 50 μL de etanol 100%. Em seguida, após breve agitação, a placa foi mantida 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 70μL 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 10μL

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).

As seqüências geradas tiveram sua qualidade avaliada pela utilização dos softwares PHRED/PHRAP/CONSED e posteriormente foram alinhadas e verificadas quanto à similaridade em sequências depositadas no GenBank utilizando-se a ferramenta BLAST – Basic Local Aligment System (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi), BioEdit – Biological Sequence Alignment Editor (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html) e Blat – Human Genome Search (genome.brc.mcw.edu/cgi-bin/hgBlat).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, D. H.; WALLACE, M.; BENNIE, T.; et al. Cervical Dysplasia and High-Risk Human Papillomavirus Infections among HIV-Infected and HIV-Uninfected Adolescent Females in South Africa. , v. 2014, 2014. Hindawi Publishing Corporation.

ALEMI, M.; MOHABATKAR, H. In Silico Comparison of Low- and High-Risk Human Papillomavirus Proteins. , p. 188–195, 2014.

ALENCAR. T. R. Análise da Variabilidade Genética, filogenia e expressão gênica de HPV de alto risco no Distrito Federal. p. 1-136, 2009.

ALSHENAWY, H. A. Evaluation of p16, human papillomavirus capsid protein L1 and Ki-67 in cervical intraepithelial lesions: Potential utility in diagnosis and prognosis. **Pathology – Research and Practice**, v. 210, p. 916-921, 2014.

AJIRO, M.; ZHENG, Z.M.; E6^E7, a Novel Splice Isoform Protein of Human Papillomavirus 16, Stabilizes Viral E6 and E7 Oncoproteins via HSP90 and GRP78. v. 6, **mBio**, p. 1-15, 2015.

BERE, A.; TAYIB, S.; KRIEK, J.; et al. Altered phenotype and function of NK cells infiltrating Human Papillomavirus (HPV) -associated genital warts during HIV infection ☆. **Clinical Immunology**, v. 150, n. 2, p. 210–219, 2014. Elsevier Inc. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2013.12.005>. .

BOUMBA, A. L. et al. Specific genotypes of human papillomavirus in 125 high-grade squamous lesions and invasive cervical cancer cases from Congolese women. **BMC public health**, v. 14, n. 1, p. 1320, 2014.

BOULET, G. A. V.; HORVATH, C. A. J.; BERGHMANS, S.; BOGERS, J. Human Papillomavirus in Cervical Cancer Screening: Important Role as Biomarker. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 17, n. 4, p. 810–817, 2008. Disponível em: <http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-07-2865>. Acesso em: 7/4/2015.

CALLEGARI, E. T.; TABRIZI, S. N.; PYMAN, J.; et al. How best to interpret mixed human papillomavirus genotypes in high-grade cervical intraepithelial neoplasia lesions. **Vaccine**, v. 32, n. 32, p. 4082–8, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24857693>. Acesso em: 7/4/2015.

CAMARGO, M.; LEON, S. C. S.; MUNOZ, M.; et al. Human papillomavirus detection in women with and without human immunodeficiency virus infection in Colombia. , v. 14, n. 1, p. 1–10, 2014.

CASTELLSAGUÉ, X., et al. Human papillomavirus detection in cervical neoplasia attributed to 12 high-risk human papillomavirus genotypes by region. **Papillomavirus Research**, v. 2, p. 61-69, 2016.

CHAN, Y.-H.; LO, C.-M.; LAU, H.-Y.; LAM, T.-H. Vertically transmitted nasopharyngeal infection of the human papillomavirus: does it play an aetiological role in nasopharyngeal cancer? **Oral oncology**, v. 50, n. 5, p. 326–9, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24486206>. Acesso em: 7/4/2015.

CHEN, J.; XUE, Y.; POIDINGER, M.; et al. Mapping of HPV transcripts in four human cervical lesions using RNAseq suggests quantitative rearrangements during carcinogenic progression. **Virology**, v. 462-463, p. 14–24, 2014. Elsevier. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2014.05.026>. .

DAMES, D. N.; BLACKMAN, E.; BUTLER, R.; et al. High-Risk Cervical Human Papillomavirus Infections among Human Immunodeficiency Virus-Positive Women in the Bahamas. , v. 9, n. 1, p. 1–7, 2014.

DOORBAR, J. Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. , v. 23, p. 297–313, 2007.

DOOBAR, J. et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Reviews in Medical Virology**, v. 25, p. 2-23, 2015.

EKALAKSANANAN, T.; MALAT, P.; PIENTONG, C. Local Cervical Immunity in Women with Low-grade Squamous Intraepithelial Lesions and Immune Responses After Abrasion. , v. 15, p. 4197–4201, 2014.

FREGA, A. et al. Follow-up of High-grade Squamous Intra-epithelial Lesions (H-SILs) in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-positive and Human Papillomavirus (HPV)-positive Women. Analysis of Risk Factors. **Anticancer research**, v. 26, p. 3167–3170, 2006.

GARLAND S. M. et al. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med* 2007; **356**: 1928-1943 [PMID: 17494926 DOI: 10.1056/NEJMoa061760]

GAUSON, E. J.; WINDLE, B.; DONALDSON, M. M.; et al. Regulation of human genome expression and RNA splicing by human papillomavirus 16 E2 protein. **Virology**, v. 468-470, p. 10–18, 2014. Elsevier. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2014.07.022>. .

GIULIANO, A. R.; NYITRAY, A. G.; KREIMER, A. R.; et al. EUROGIN 2014 roadmap: Differences in human papillomavirus infection natural history, transmission and human papillomavirus-related cancer incidence by gender and anatomic site of infection. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 00, p. 1–9, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25043222>. Acesso em: 21/3/2015.

GOMEZ, J. A.; LEPETIC, A.; DEMARTEAU, N. Health economic analysis of human papillomavirus vaccines in women of Chile : perspective of the health care payer using a Markov model. , p. 1–13, 2014.

HAEDICKE, J.; IFTNER, T. Human papillomaviruses and cancer. **Radiotherapy and Oncology**, v. 108, n. 3, p. 397–402, 2013.

HAHNE, T.; PALANIYANDI, M.; KATO, T.; et al. Characterization of human papillomavirus 6b L1 virus-like particles isolated from silkworms using capillary zone electrophoresis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 118, n. 3, p. 311–314, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.02.026>. .

HALEC, G.; ALEMANY, L.; LLOVERAS, B.; et al. Pathogenic role of the eight probably / possibly carcinogenic HPV types 26 , 53 , 66 , 67 , 68 , 70 , 73 and 82 in cervical cancer. , , n. September, p. 441–451, 2014.

HARPER D. M. et al. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like parti-cle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from arandomised control trial. Lancet 2006; 367(9518):1247–55.

HU, Z.; ZHU, D.; WANG, W.; et al. Genome-wide profiling of HPV integration in cervical cancer identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism. **Nature Genetics**, v. 47, n. 2, p. 158–163, 2015. Disponível em: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ng.3178>. Acesso em: 7/4/2015.

INÉS, B.; MARIA, T.; ANDRÉS, C.; et al. Infection , Genetics and Evolution Genetic characterization and clinical implications of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants from northeastern Argentina. , v. 29, p. 103–109, 2015.

KAWANA K, YASUGI T, TAKETANI Y. Human papillomavirus vaccines: current issuesand future: review. Indian J Med Res 2009;130(3):341–7.

KAWANA, K. et al. Oral vaccination against HPV E7 for treatment of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3) elicits E7-specific mucosal immunity in the cervix of CIN3 patients. **Vaccine**, v. 32, n. 47, p. 6233–6239, 2014.

KNOFF, J.; YANG, B.; HUNG, C. F.; WU, T.C. Cervical Cancer: Development of Targeted Therapies Beyond Molecular Pathogenesis. **Current Obstetrics and Gynecology Reports**, v. 3(1), p. 1-24, 2014.

KUKIMOTO, I.; MURAMATSU, M. Genetic Variations of Human Papillomavirus Type 16: Implications for Cervical Carcinogenesis. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, 2015. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/advpub/0/advpub_JJID.2014.584/_article>. Acesso em: 7/4/2015.

LIMA, M. D. M.; BRAZ-SILVA, P. H.; PEREIRA, S. M.; et al. International Journal of Gynecology and Obstetrics Oral and cervical HPV infection in HIV-

positive and HIV-negative women attending a sexual health clinic in São Paulo , Brazil. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 126, n. 1, p. 33–36, 2014. International Federation of Gynecology and Obstetrics. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijgo.2014.01.017>. .

LIN, K.; LU, X.; CHEN, J. U. N.; et al. E6-associated transcription patterns in human papilloma virus 16-positive cervical tissues. , p. 478–482, 2015.

LU, S.; CONG, X.; LI, M.; et al. Distribution of High-Risk Human Papillomavirus Genotypes in HPV-Infected Women in Beijing , China. , v. 507, n. August 2014, p. 504–507, 2015.

MCGRAW, S. L. Update on prevention and screening of cervical cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n. 4, p. 744, 2014.

MELONI, A.; PILIA, R.; CAMPAGNA, M.; et al. Prevalence and molecular epidemiology of human papillomavirus Infection in Italian women with cervical cytological abnormalities. , v. 3, 2014.

MORSHED, K.; POLZ-GRUSZKA, D.; SZYMA, M.; POLZ-DACEWICZ, M. ScienceDirect Human Papillomavirus (HPV) – Structure , epidemiology and pathogenesis epidemiologia i patogeneza. , v. 8, p. 4–10, 2014.

MUNRO, A.; SPILSBURY, K.; COHEN, P. Utilisation of co-testing (human papillomavirus DNA testing and cervical cytology) after treatment of CIN : a survey of GPs ' awareness and knowledge. , v. 44, n. 1, p. 64–68, 2015.

MURALL, C. L.; BAUCH, C. T.; DAY, T. Could the Human papillomavirus vaccines drive virulence evolution? **Nature communications, submitted**, 2014.

MURATA, Y.; LIGHTFOOTE, P. M.; ROSE, R. C.; WALSH, E. E. Antigenic presentation of heterologous epitopes engineered into the outer surface-exposed helix 4 loop region of human papillomavirus L1 capsomeres. **Virology**

Journal, v. 6, n. 1, p. 81, 2009. Disponível em: <http://www.virologyj.com/content/6/1/81>. Acesso em: 7/4/2015.

PARIS, C. et al. CCCTC-Binding Factor Recruitment to the Early Region of the Human Papillomavirus Type 18 Genome Regulates Viral Oncogene Expression. **Journal of Virology**, v. 44, n. February, p. JVI.00097–15, 2015.

RESZEć J. et al. Wirus brodawczaka ludzkiego a proces apoptoz. Post Biol Kom 2003;2:311–323.

RIZZO, R.; GENTILI, V.; ROTOLA, A.; et al. Implication of HLA-C and KIR Alleles in Human Papillomavirus Infection and Associated Cervical Lesions. , v. 27, n. 9, p. 468–470, 2014.

RODRÍGUEZ MI, FINBOW ME, ALONSO A. Binding of human papillomavirus 16 E5 to the 16 kDa subunit c (proteolipid) of the vacuolar H+-ATPase can be dissociated from the E5-mediated epidermal growth factor receptor overactivation. Oncogene 2000; 19:3727- 32; PMID:10949926; http://dx.doi.org/10.1038/ sj.onc.1203718

ROOS, P. et al. In North America, Some Ovarian Cancers Express the Oncogenes of Preventable Human Papillomavirus HPV-18. **Scientific Reports**, v. 5, p. 8645, 2015.

ROSALES, R. et al. Regression of Human Papillomavirus Intraepithelial Lesions Is Induced by MVA E2 Therapeutic Vaccine. **Human Gene Therapy**, v. 25, n. December, p. 1035–1049, 2014.

RYNDOCK, E. J.; MEYERS, C. A risk for non-sexual transmission of human papillomavirus? **Expert review of anti-infective therapy**, v. 12, n. 10, p. 1165–70, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25199987>. Acesso em: 7/4/2015.

SAAVEDRA, K.; BREBI, P.; ROA, J. C. Epigenetic alterations in preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix. , p. 1–7, 2012.

SIKORSK M. Human Papillomavirus w ginekologii. wyd.. Bielsko-Biała: alfa-medica press; 1998.

TAYLOR, P.; STREET, M.; WT, L.; et al. Anti-tumor effects of genetic vaccines against HPV major oncogenes. , , n. March, p. 37–41, 2015.

TOOTS, M.; MA, A. The Transcription Map of Human Papillomavirus Type 18 during Genome Replication in U2OS Cells. , p. 1–31, 2014.

VIETÍA, D.; LIUZZI, J.; AVILA, M.; et al. Human papillomavirus detection in head and neck squamous cell carcinoma. **Ecancermedicalscience**, v. 8, p. 475, 2014. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4208923&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 7/4/2015.

VUYST, H. DE; MUGO, N. R.; FRANCESCHI, S.; et al. Residual Disease and HPV Persistence after Cryotherapy for Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2 / 3 in HIV- Positive Women in Kenya. , v. 9, n. 10, p. 6–13, 2014.

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Reviews Cancer**, v.7, p. 11-22, 2007.

ZHANG, H.-Y.; FEI, M.-D.; JIANG, Y.; et al. The diversity of human papillomavirus infection among human immunodeficiency virus-infected women in Yunnan, China. **Virology Journal**, v. 11, n. 1, p. 202, 2014. Disponível em: <http://www.virologyj.com/content/11/1/202>. Acesso em: 7/4/2015.

ZHANG, R.; HE, Y.; CHEN, M.; et al. Diagnosis of 25 genotypes of human papillomaviruses for their physical statuses in cervical precancerous /

cancerous lesions : a comparison of E2 / E6E7 ratio-based vs . multiple E1-L1 / E6E7 ratio-based detection techniques. , p. 1–16, 2014.

ZHOU, N.; DING, B.; AGLER, M.; COCKETT, M.; MCPHEE, F. Lethality of PAK3 and SGK2 shRNAs to Human Papillomavirus Positive Cervical Cancer Cells Is Independent of PAK3 and SGK2 Knockdown. , p. 1–17, 2015.

Capítulo II

Artigo Científico (Submetido na revista: The Scientific World Journal)

DETECTION AND GENOTYPING OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV) AND ITS RELATIONSHIP WITH THE PRESENCE OF CERVICAL LESIONS IN WOMEN COINFECTED WITH HIV

Rodolfo Miglioli Badial[1]; Marina Carrara Dias[1]; Bruna Stuqui[1]; Patrícia Pereira dos Santos Melli[2]; Silvana Maria Quintana[3]; José Antônio Cordeiro[4]; Caroline Measso do Bonfim[1]; Marilia de Freitas Calmon[1]; Paola Jocelan Scarin Provazzi[1]; Paula Rahal[1*].

1 – São Paulo State University - UNESP, Department of Biology, São José do Rio Preto/SP, Zip Code: 15054-000, Brazil.
2 – Hospital of Ribeirão Preto School of Medicine - HC-FMRP, Department of Obstetrics and Gynecology, Ribeirão Preto/SP, Zip Code: 14048-900, Brazil.
3 – University of São Paulo - USP, Medical School of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto/SP, Zip Code: 14049-900, Brazil.
4 – Faculty of Medicine of São José do Rio Preto – FAMERP, São José do Rio Preto/SP, Zip Code: 15090-000, Brazil.

Contact Information:

Rodolfo Miglioli Badial e-mail: rodolfo_mb@hotmail.com
Marina Carrara Dias e-mail: marinacarrara@gmail.com
Bruna Stuqui e-mail: bru.stuqui@gmail.com
Patricia Pereira dos Santos Melli e-mail: patimelli@gmail.com
Silvana Maria Quintana e-mail: smquintana64@gmail.com
Caroline Measso do Bonfim e-mail: carol.unespbio@yahoo.com.br
José Antônio Cordeiro e-mail: joseantoniocordeiro70@gmail.com
Marilia de Freitas Calmon e-mail: macal131@gmail.com
Paola Jocelan Scarin Provazzi e-mail: paolaprovazzi@gmail.com
Paula Rahal* e-mail: rahalp@yahoo.com.br

* Corresponding author
Laboratory of Genome Studies, São Paulo State University – UNESP
Addres: Cristóvão Colombo Street, 2265 – Jardim Nazareth
CEP 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.
Phone: +55 17 3221-2379.

ABSTRACT

Background: HPV have been identified and classified in high risk and low risk, depending on their association with the cancer development. High risk HPVs are associated with CIN II, CIN III and cervical cancers. Low risk HPV types can cause CIN I, such as genital warts and rarely are detected in malignant neoplasms. HPV infections can be facilitated by co-infection with HIV, which can reduce the spontaneous elimination of HPV. Here we investigated the presence and genotype of HPV in patients co-infected with HIV, as well the risk factors of the coinfection HPV/HIV.

***Methods*:** 80 *swab* cervical samples collected in two different years, from 40 HIV patients were utilized in the polymerase chain reaction (PCR) for HPV detection and DNA HPV sequencing reaction methods. Statistical analyzes was performed regarding to risk factors of HPV/HIV coinfection and occurrence of cervical lesions.

Results: It was observed the presence of HPV in 59 samples (73.75%) and high risk HPVs were predominant among the HPV types detected (59.3%). The most frequent types were HPV56 (17%) following by HPV16 (15.3%). No association was observed between cervical lesions and age (p=0.84) as well HPV presence in both collected samples (p=0.25/p=0.63). When the risk factor analyzed was CD4 count, no association was found with the occurrence of cervical lesions in the collected samples (p=0.15/p=0.28). The HIV viral load was associated with the occurrence of cervical lesions in the second collected sample (p=0.045); but the same result was not observed in the first collected sample (p=0.12).

Conclusions: The high prevalence of the HPV 16 and HPV 56 evidence the importance to include the type 56 in the HPV vaccines once, the monitoring of patients infected with the HPV 56 could contribute to a better prognostic for the HPV infection. The association between HIV viral load and the lesions confirm the importance to monitor HIV/HPV coinfected patients with high HIV viral load.

Keywords: HPV; cervical lesions, HIV coinfection.

Introduction

Papillomaviruses are circular and double stranded DNA viruses with a genome of, approximately 8 kb, presents icosahedral form and 55nm in size [1, 2, 3]. These viruses are also non-enveloped and can induce squamous epithelial tumors (warts and papillomas) in many different anatomical sites [1].

The human papillomavirus (HPV) has over 200 identified viral types and can be classified in two groups, high risk and low risk, depending on their association with cancer development [4, 5, 6]. The most common high risk HPV types are 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 68; and they are associated with moderate and high grade cervical lesions and cervical cancers [7]. HPV types 16 and 18 are responsible for, approximately, 70% of cervical cancer cases [8]. The most common low risk HPV types are 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 and 81; and they can cause cervical lesions of low grade, such as genital warts (condyloma) and benign cervical lesions and rarely are detected in malignant neoplasms [7, 9, 10].

High risk HPV types, once integrated into the host genome, exert their oncogenic effects primarily through the continuous expression of the oncoproteins E6 and E7 [5]. These oncoproteins play a central role in HPV-dependent malignant transformation and are expressed in cervical cancer [1, 11]. The E6 and E7 proteins target tumor suppressor proteins, such as p53 and retinoblastoma (pRB), to induce cell proliferation, evade apoptosis, genome instability and escape from the innate immune system [12, 13, 14].

High risk HPV infection plays a necessary role in the development of cervical cancer, which is the third most frequent gynecological malignancy in women worldwide [15]. It has been estimated that about 529.800 new cases and 275.100 deaths occur each year in the world [15, 16]. In Brazil, the estimated of occurrence are about 16.340 new cases and 5.430 of deaths in one year [17].

Invasive cervical carcinoma is preceded by precursor lesions that are characterized by cellular maturation disorders, layering, and atypical core. The precursor lesions can be histologically classified as cervical intraepithelial

neoplasia (CIN) with three grades (low grade - CIN I; moderate grade - CIN II; and high grade to carcinoma *in situ* - CIN III) or cytologically as squamous intraepithelial lesions (SIL) [18, 19]. Due to these premalignant stages well defined, cervical cancer is particularly amenable to screening. The classical method of screening is based in the smear cytological evaluation [18].

Women infected with human immunodeficiency virus (HIV) are at great risk for HPV infection and persistence, increasing the risk of abnormalities in the cervical cells and invasive cervical cancer [20, 21]. HIV infection leads to a decline in both the number and function of CD4+ T cells and this can lead to a high infection of HPV, which reduces the chance of their spontaneous elimination [20, 22].

HPV DNA detection tests can be implemented as an auxiliary tool, in combination with cervical cytology, to improve the management of patients at risk for cervical disease [23], primarily in HIV positive patients. HPV genotyping is other important test that can contribute to the prevention of invasive cervical cancer [24] and is essential to the better knowledge of the high risk types of HPV for the introduction of an effective immunization program. This information is also necessary to evaluate the benefit of the vaccines, especially the nonevalent vaccine that can prevent against the infection of the four HPV types present in quadrivalent vaccine (HPV6, 11, 16 and 18) and more five (HPV 31, 36, 45, 52, and 58) and this can auxiliary the prevention of cervical cancer in the population [25].

The objective of this study was to detect and genotype HPV in cervical samples from HIV infected patients, regarding to the prevalence and frequency of HPV genotypes, for a better understanding of the contribution of HIV to the HPV infection, treatment and cervical cancer prevention.

Methods

Clinical Samples

The project was approved and ethical permission was obtained from the Research Committee of the Department of Gynecology and Obstetrics of the

Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo and by the Ethics Committee at the Hospital Research (HC-FMRP/USP), Project 233 approved on 15 November 2009.

The study evaluated 80 cervical *swabs* samples from 40 female patients diagnosed with HIV infection. The samples were previously collected in one year apart in the periods from 2010 to 2011 (considered collect I) and from 2011 to 2012 (considered collect II), in which were performed the Pap test procedures, colposcopy and possibly directed biopsy. Clinical pathological data from patients included in the study were collected from medical records of Ambulatory of Infectious Diseases of Gynecology and Obstetrics (AMIGO) at the Clinical Hospital (HC-FMRP/USP) located in the city of Ribeirão Preto, in São Paulo State, Brazil.

The DNA sample was extracted using the Phenol method [26].

Nested Polymerase Chain Reaction (NESTED-PCR)

The polymerase chain reaction (PCR) methodology was used to amplify the DNA of human papillomavirus present in cervical *swab* samples. The oligonucleotides PGMY09 (5-CGT CCM ARR GGA WAC TGATC- 3) and PGMY11 (5-GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3) were used, which are degenerated sequences to detect viral DNA. The amplification products were used in a nested PCR with the oligonucleotides GP5+ (5-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3) and GP6+ (5-CTTATACTAAATGTCAAATAAAAA-3), which amplify a sequence of internal 150 bp to the fragment produced by the pair of oligonucleotides PGMY09/PGMy11 [27]. The products of the amplifications were electrophoretic run on 1% agarose gel.

Sequencing

The sequencing was carried out according to the Sanger technique [28], using the *BigDye terminator* kit (*Applied Biosystems/Life Technologies*, Foster City, CA, USA). A sequence of 34 bases downstream of the GP5+ binding site

was used for accurate genotyping of HPV types [29]. The generated sequences were quality assessed by use of PHRED/PHRAP/CONSED software and were then aligned and checked for similarity with the sequences deposited in GenBank using the BLAST tool - Basic Local Aligment System (www.ncbi.nlm.nih.gov/ blast / Blast.cgi) BioEdit – Biological Sequence Alignment Editor (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html) and Blat - Human Genome Search (genome.brc.mcw.edu/cgi-bin/hgBlat).

Statistical analysis

Depending on the nature of the variables, statistical tests were used: qualitative variables were analyzed by Pearson test, and means of quantitative variables were compared by T test, or, when recommended, by Fisher test. The Pearson coefficient was calculated to search for correlations between HPV and cervical lesions, antiretroviral therapy (ART) and cervical lesions, age and cervical lesions, CD4 count and cervical lesions and HIV viral load (VL) and cervical lesions. P-value > 0.05 was considered no significant.

Results

Fifty nine samples (73.75%) were HPV positive, of which thirty-five (59.4%) were high risk HPV (16 in collect I and 19 in collect II) and twenty-four (40.6%) were low risk HPV (14 in collect I and 10 in collect II) (Table 1). Regarding to patients, thirty-four (85%) evidenced the presence of HPV, of which twenty-five (73.53%) presented HPV in both collected samples and nine (26.5%) presented HPV in one of the collected samples. Six patients (15%) did not present HPV in both samples collected. Twenty-three patients (57.5%) were high risk HPV and seventeen (42.5%) were low risk HPV in at least one of the collected samples. Twelve patients (30%) presented high risk HPV and seven patients (17.5%) presented low risk HPV in both collected samples (Table 2).

The patients' demographic information and risk factors were collected and analyzed. The mean age was 39,9 years (standard deviation: 8.92) in the patients with lesions and 40,6 years (standard deviation: 11.5) in patients

without lesion. The total of mean age was 46 years. All 40 patients were diagnosed with the presence of HIV, of which, 34 (85%) were under antiretroviral therapy (ART) in collect I and 32 patients (80%) were under antiretroviral therapy in collect II. The mean of CD4 count in this study was 635.8 cell/mm^3 (standard deviation: 320.9 cell/mm^3 and median: 647.0 cell/mm^3) in collect I and 644.5 cell/mm^3 (standard deviation: 351.2 cell/mm^3 and median: 658.0 cell/mm^3) in collect II. The limit of detection of HIV viral load was 50 copies/mL, and in both collects the HIV viral load was below 50 copies/mL. Regarding to cervical lesions, in collect I, 29 (72.5%) HIV positive patients did not present lesions, while 11 patients presented lesions, corresponding to 27.5% of the cases. In collect II, 31 (77.5%) patients did not present lesions, while 9 patients present lesions, corresponding to 22,5% of cases. No association was observed between cervical lesions and age (p=0.84) as well HPV presence in both collected samples (p=0.25/p=0.63). When the risk factor analyzed was CD4 count, no association was found with the occurrence of cervical lesions in the collected samples (p=0.15/p=0.28). The HIV viral load was associated with the occurrence of cervical lesions in the collect II samples (p=0.045) (Table 3).

The HPV56 was the predominant type in cervical *swab* samples, corresponding to 17% (10/59) of the identified types, followed by HPV16, which was found in 15.3% (9/59) of the cases. The HPV81 was detected in 10.2% (6/59), HPV62 in 6.8% (4/59), HPV83 in 3.4% (2/59) and HPV types 6, 18, 26, 33, 52, 59, 72, 74, 90 and 114 occurred in 1.7% (1/59) of sequenced samples (Table 2).

Table 1. Percentage of occurrence of high risk HPV and low risk HPV types in cervical *swab* samples from HIV infected women.

	Collect I	**Collect II**	**Total Samples**
High risk HPV	16/30 (54%)	19/29 (65%)	35/59 (59.4%)
Low risk HPV	14/30 (46%)	10/29 (35%)	24/59 (40.6%)

Table 2. HPV positivity and HPV types in HIV infected women.

	Collect I			Collect II		
Patients	**HPV positive**	**Type**	**HR/LR**	**HPV positive**	**Type**	**HR/LR**
1	No			No		
2	Yes	HPV56	HR	Yes	HPV56	HR
3	Yes	HPV31	HR	Yes	HPV81	LR
4	Yes	HPV62	LR	Yes	HPV62	LR
5	No			Yes	HPV56	LR
6	Yes	HPV11	LR	No		
7	Yes	HPV26	HR	Yes	HPV52	HR
8	Yes	HPV11	LR	No		
9	No			No		
10	Yes	HPV54	LR	Yes	HPV54	LR
11	Yes	HPV16	HR	Yes	HPV56	HR
12	Yes	HPV67	HR	Yes	HPV42	LR
13	Yes	HPV56	HR	Yes	HPV56	HR
14	No			Yes	HPV18	HR
15	Yes	HPV67	HR	Yes	HPV6	LR
16	Yes	HPV66	HR	Yes	HPV56	HR
17	Yes	HPV56	HR	Yes	HPV16	HR
18	Yes	HPV16	HR	No		
19	Yes	HPV56	HR	No		
20	No			No		
21	Yes	HPV16	HR	Yes	HPV16	HR
22	Yes	HPV81	LR	Yes	HPV81	LR
23	No			No		
24	Yes	HPV31	HR	Yes	HPV16	HR
25	Yes	HPV66	HR	Yes	HPV114	HR
26	Yes	HPV62	LR	Yes	HPV62	LR
27	Yes	HPV16	HR	Yes	HPV16	HR
28	No			Yes	HPV81	LR
29	No			Yes	HPV74	LR
30	Yes	HPV81	LR	Yes	HPV66	HR
31	Yes	HPV90	LR	Yes	HPV83	LR
32	Yes	HPV55	LR	Yes	HPV55	LR
33	Yes	HPV70	HR	Yes	HPV70	HR
34	Yes	HPV70	HR	Yes	HPV81	LR
35	No			No		
36	Yes	HPV33	HR	Yes	HPV83	LR
37	Yes	HPV42	LR	Yes	HPV72	LR

38	Yes	HPV59	HR	Yes	HPV56	HR
39	No			No		
40	No			Yes	HPV16	HR

LR: Low risk, HR: High risk.

Table 3. Risk Factor data and its percentage of occurrence and statistical analysis between risk factors and occurrence of cervical lesions in HIV infected women.

	Collect I	**Total Patients**	**p-value**	**Collect II**	**Total Patients**	**p-value**
Age						
With Lesion	39,9 (St= 8.92)		0.84	39,9 (St= 8.92)	40/40	0.84
Without Lesion	40,6 (St = 11.5)			40,6 (St = 11.5)		
HPV Infection						
Yes	30 (75%)	40/40	0.25	29 (72.5%)	40/40	0.25
No	10 (25%)			11 (27.5%)		
Mean	51,17			53,14		
Standard Deviation	27,29			22,79		
Median	56			56		
CD4 Count						
Mean	635.8 cell/mm3	39/40	0.15	644.5 cell/mm3	39/40	0.28
Standard Deviation	320.9 cell/mm3			351.2 cell/mm3		
Median	667.0 cell/mm3			658 cell/mm3		
HIV viral load						
	>= 50 copies/mL	38/40	0.12	>= 50 copies/mL	39/40	0.045*
ART						
Yes	34 (85%)	40/40		32 (80%)	40/40	
No	6 (15%)			8 (12%)		
HIV infection						
Yes	40 (100%)	40/40		40 (100%)	40/40	
No	0			0		
Cervical Lesions						
Yes	11 (27.5%)	40/40		9 (22,5%)	40/40	
No	29 (72.5%)			31(77,5%)		

St: Standard Deviation, * Statistically significant.

Discussion

It is well known that women infected with HIV are at increased risk of cervical cancer development due to a great risk of HPV infection and persistence as result of immunosuppression. HIV-infected women have a high prevalence of a broad range of HPV genotypes, multiple concurrent infections and persistent infections, which progress to neoplasia as compared to HIV negative women [30].

In this study, we found a prevalence of 73.5% of HPV in HIV-positive women. High risk HPV infection prevalence in HIV-positive women has been reported in worldwide studies; it was found 44% of HPV infection in European countries [31] and 54%-73% HPV prevalence in the United States [32, 33]. Similar data were observed for Latin-American countries like Brazil where 48% to 68% HPV prevalence has been found in HIV-positive women [34].

High risk HPV subtypes were found in 57.5% of our patient samples. A report comparing the distribution of HPV genotypes in South African, found high risk HPV prevalence of 75% [35] compared to another study wich found the prevalence of 60% [24]. Marais [36] have reported similar high risk HPV prevalence (60%) between HIV-infected and HIV-uninfected South African women [24, 36]. Another study of Heard [37], with women HIV positive women, from Europeans centers, had a high prevalence (49.5%) of infection with high risk HPV genotypes [37].

The most frequent genotype in our study was the HPV56 followed by HPV16. Similarly, Luque [38] determined that high risk types other than 16 were the most prevalent in a diverse population of HIV-positive women in Rochester, New York. In this population HPV type 56 occurred most frequently [21]. Four independent studies also reported high frequency of HPV56 [30, 39, 40, 41] and in a study of Castellsagué [42] HPV 56 was the most common type in women aged 24-45, close to the age of the patients in our study where the mean age was 46 years.

HPV16 and HPV56 were third and the fifth most frequent genotype in patients with cervicits/CIN I respectively [43] and in cases with multiple HPV

infections, HPV16 and HPV56 had higher risk of being present in CIN II lesions [41]. In our study, HIV coinfected patients with HPV56 and HPV16 had CIN I/ II and CIN II/III respectively. How HPV 56 was not present in the nonevalent vaccine, and may still be responsible for some CIN I, and to a lesser extent CIN II/III [42], and is the most prevalent in different regions, is important it identification and knowledge.

Our study showed a low prevalence of HPV16 (15.3%), despite it being the second most frequent. The lower prevalence of HPV16, the most important high risk HPV type, in HIV-positive women had been observed after studies showed that HPV16 infection itself was affected by HIV status than other high risk HPV [44]. Some experts have hypothesized that HPV16 has better evolutionary ability to escape the effects of immune surveillance, while non-HPV16 genotypes are often better controlled by immune response, such as among women with competent immune systems [44, 45]. In women with progressively weakening immune systems, it is thought that the immune control over non-HPV16 types is lost and they appear with greater preponderance than in women with competent immune systems [45].

Regarding demographic characteristics, no statistically significant differences were identified between cervical lesions and the age as well for presence of HPV in the HIV infected women, suggesting that the degree of immunosuppression is not associated with an increased persistence of HPV infection that can lead to cervical diseases, the same was observed by Madeddu [46] with regard age and HPV infection.

When we analyzed the immuno-virological parameter, statistically significant association was identified between HIV viral load and cervical lesions occurrence. Camargo [47] describe that high HIV viral load, significantly increases the risk of developing CIN incidence rates because of the fact that the high HIV viral load could facilitate acquiring HPV infection [37, 47]. Studies of Heard [48] and Tate and Anderson [49] showed that HIV positive patients with recurrent dysplasia were more likely to present high HIV viral load [50]. A Cape

Town study by Denny [51] also noted that abnormal cytology of cervix and high risk HPV positivity were strongly correlated with high HIV viral loads [52].

Regarding to CD4 count, no statistical association was observed with occurrence of cervical lesions. A study in Finland of 153 HIV-positive women showed that the risk of CIN was not associated with CD4 count and that the prevalence of SIL was not associated with the degree of immunosuppression in a work of 298 HIV-positive patients screened by cytology and colposcopy [46, 53].

In this study the median of CD4 count was 635.8 cell/mm^3 in collect I and 644.5 cell/mm^3 in collect II. A positive association was seen for women having lower than 200 cell/mm^3 CD4 count with abnormal cytological findings, compared to those having higher CD4 count, thereby agreeing with a previous report of Garbuglia [31] lower than 200 cell/mm^3 count indicates a deficient immune system and, together with HPV detection, could be used as predictors of pre-neoplastic cervical lesions [47].

When we look at the role of antiretroviral therapy (ART) on the development cervical lesions, the fact that the CD4 counts were high and 82.5% of women were on ART is consistent with the hypothesis that ART does not prevent progression to cervical cancer and similar findings were observed by Ramogola-Marise [54]. In contrast it has been shown that HIV viral load and CD4 count have a strong association with the prevalence of HPV infection. Our study did not observe this significant association regarding to CD4 count and one of the probable reason is the small number of patients. However, the increased availability, uptake and adherence to ART regimes have reduced the level of immunosuppression and HIV load in infected patients. This might reduce the incidence of precancerous lesions and cervical cancers [37].

Conclusion

In conclusion, our results show a high prevalence of the HPV 16 and HPV 56 types among the samples analyzed, and evidence the importance to include the type 56 in the HPV vaccines. Once the genotype 56 was the most

prevalent, monitoring the patients infected with the HPV 56 could prevent the cervical cancer and contribute to a better prognostic for the HPV infection. The results also corroborate the literature once the HIV viral load and the presence of lesions was statistically significant, confirming the importance to monitor HIV/HPV coinfected patients with high HIV viral load.

Acknowledgments

This work was supported by Foundation for Research Support of the State of São Paulo (FAPESP) The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and The Coordination of higher education personnel (CAPES).

Competing Interests

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

References

[1] MORSHED, K.; POLZ-GRUSZKA, D.; SZYMA, M.; POLZ-DACEWICZ, M. ScienceDirect Human Papillomavirus (HPV) – Structure , epidemiology and pathogenesis epidemiologia i patogeneza. , v. 8, p. 4–10, 2014.

[2] HAHNE, T.; PALANIYANDI, M.; KATO, T.; et al. Characterization of human papillomavirus 6b L1 virus-like particles isolated from silkworms using capillary zone electrophoresis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 118, n. 3, p. 311–314, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <...http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.02.026>.

[3] VIETÍA, D.; LIUZZI, J.; AVILA, M.; et al. Human papillomavirus detection in head and neck squamous cell carcinoma. **Ecancermedicalscience**, v. 8, p. 475, 2014. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=42089&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 7/4/2015.

[4] ALEMI, M.; MOHABATKAR, H. In Silico Comparison of Low- and High-Risk Human Papillomavirus Proteins. , p. 188–195, 2014.

[5] ZHOU, N.; DING, B.; AGLER, M.; COCKETT, M.; MCPHEE, F. Lethality of PAK3 and SGK2 shRNAs to Human Papillomavirus Positive Cervical Cancer Cells Is Independent of PAK3 and SGK2 Knockdown. , p. 1–17, 2015.

[6] PARIS, C. et al. CCCTC-Binding Factor Recruitment to the Early Region of the Human Papillomavirus Type 18 Genome Regulates Viral Oncogene Expression. **Journal of Virology**, v. 44, n. February, p. JVI.00097–15, 2015.

[7] LU, S.; CONG, X.; LI, M.; et al. Distribution of High-Risk Human Papillomavirus Genotypes in HPV-Infected Women in Beijing , China. , v. 507, n. August 2014, p. 504–507, 2015.

[8] MELONI, A.; PILIA, R.; CAMPAGNA, M.; et al. Prevalence and molecular epidemiology of human papillomavirus Infection in Italian women with cervical cytological abnormalities. , v. 3, 2014.

[9] HAEDICKE, J.; IFTNER, T. Human papillomaviruses and cancer. **Radiotherapy and Oncology**, v. 108, n. 3, p. 397–402, 2013.

[10] RIZZO, R.; GENTILI, V.; ROTOLA, A.; et al. Implication of HLA-C and KIR Alleles in Human Papillomavirus Infection and Associated Cervical Lesions. , v. 27, n. 9, p. 468–470, 2014.

[11] ROOS, P. et al. In North America, Some Ovarian Cancers Express the Oncogenes of Preventable Human Papillomavirus HPV-18. **Scientific Reports**, v. 5, p. 8645, 2015.

[12] LIN, K.; LU, X.; CHEN, J. U. N.; et al. E6-associated transcription patterns in human papilloma virus 16-positive cervical tissues. , p. 478–482, 2015.

[13] HALEC, G.; ALEMANY, L.; LLOVERAS, B.; et al. Pathogenic role of the eight probably / possibly carcinogenic HPV types 26 , 53 , 66 , 67 , 68 , 70 , 73 and 82 in cervical cancer. , , n. September, p. 441–451, 2014.

[14] AJIRO, M.; ZHENG, Z.M.; E6^E7, a Novel Splice Isoform Protein of Human Papillomavirus 16, Stabilizes Viral E6 and E7 Oncoproteins via HSP90 and GRP78. v. 6, **mBio**, p. 1-15, 2015.

[15] JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 61, p. 69–90, 2011.

[16] ZOA-ASSOUMOU, S. et al. Human papillomavirus genotypes distribution in cervical cancer cases in Gabon. **Infectious Agents and Cancer**, v. 11, p. 1-5, 2016.

[17] INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Estimativa 2016. Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015.

[18] BOULET, G. A. V.; HORVATH, C. A. J.; BERGHMANS, S.; BOGERS, J. Human Papillomavirus in Cervical Cancer Screening: Important Role as Biomarker. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 17, n. 4, p. 810–817, 2008. Disponível em: <./-- http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-07-2865>

[19] ALSHENAWY, H. A.; Evaluation of p16, human papillomavirus capsid protein L1 and Ki-67 in cervical intraepithelial lesions: Potential utility in diagnosis and prognosis. **Pathology – Research and Practice**, v. 210, p. 916-921, 2014.

[20] LIMA, M. D. M.; BRAZ-SILVA, P. H.; PEREIRA, S. M.; et al. International Journal of Gynecology and Obstetrics Oral and cervical HPV infection in HIV-positive and HIV-negative women attending a sexual health clinic in São Paulo , Brazil. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 126, n. 1, p. 33–36, 2014. International Federation of Gynecology and Obstetrics. Disponível em: <...http://dx.doi.org/10.1016/j.ijgo.2014.01.017>.

[21] DAMES, D. N.; BLACKMAN, E.; BUTLER, R.; et al. High-Risk Cervical Human Papillomavirus Infections among Human Immunodeficiency Virus-Positive Women in the Bahamas. , v. 9, n. 1, p. 1–7, 2014.

[22] BERE, A.; TAYIB, S.; KRIEK, J.; et al. Altered phenotype and function of NK cells infiltrating Human Papillomavirus (HPV) -associated genital warts during HIV infection ☆. **Clinical Immunology**, v. 150, n. 2, p. 210–219, 2014. Elsevier Inc. Disponível em: <...http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2013.12.005>.

[23] MUNRO, A.; SPILSBURY, K.; COHEN, P. Utilisation of co-testing (human papillomavirus DNA testing and cervical cytology) after treatment of CIN : a survey of GPs ' awareness and knowledge. , v. 44, n. 1, p. 64–68, 2015.

[24] ADLER, D. H.; WALLACE, M.; BENNIE, T.; et al. Cervical Dysplasia and High-Risk Human Papillomavirus Infections among HIV-Infected and HIV-Uninfected Adolescent Females in South Africa. v. 2014, 2014. Hindawi Publishing Corporation.

[25] BOUMBA, A. L. et al. Specific genotypes of human papillomavirus in 125 high-grade squamous lesions and invasive cervical cancer cases from Congolese women. **BMC public health**, v. 14, n. 1, p. 1320, 2014.

[26] ISOLA, J.; DE VRIES, S.; CHU, L. et al. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. **Am J Pathol**, v. 145, n. 6, p. 1301-1308, Dec. 1994.

[27] HAWS, A. L. F. et al. Nested PCR with the PGMY09/MY11 and GP5+/6+ primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. **J Virol Methods**, v. 122, n. 1, p. 87-93, 2004.

[28] SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R.; DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

[29] LEE, S. H.; VIGLIOTTI, V. S.; VIGLIOTTI, J. S.; PAPPU, S.; Validation of human papillomavirus genotyping by signature DNA sequence analysis. **Clinical Pathology**, v. 9, p. 1-10, 2009.

[30] JOSHI, S. et al., Human papillomavirus infection among human immunodeficiencyvirus-infected women in Maharashtra, India. **Vaccine**, v. 32, p. 1079-1085, 2014.

[31] GARBUGLIA, A. R., et al. Frequency and multiplicity of human papillomavirus infection in HIV-1 positive women in Italy. **J Clin Virol**, v. 54, p. 141–146, 2012.

[32] BRINKMAN, J. A., et al., Detection of human papillomavirus DNA in urine specimens from human immunodeficiency virus-positive women. **J Clin Microbiol**, v. 40, p. 3155–3161, 2002.

[33] ELLERBROCK, T. V., et al. Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women. **JAMA**, v. 283, p.1031–1037, 2000.

[34] ARAUJO, A. C., et al. Incidence of cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of HIV-infected women. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 117, p. 211–216, 2012.

[35] MCDONALD A. C., et al. Distribution of human papillomavirus genotypes among HIV-positive and HIV-negative women in Cape Town, South Africa, **Frontiers in Oncology**, v. 4, 2014.

[36] MARAIS, D. J., et al. Cervical and oral human papillomavirus types in HIV-1 positive and negative women with cervical disease in South Africa, **Journal of Medical Virology**, v. 80, p. 953–959, 2008.

[37] HEARD, I.; et al. Characteristics of HPV infection over time in European women who are HIV-1 positive. **General gynaecology**, v. 120, p. 41-49, 2012.

[38] LUQUE A. E. , et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes and related abnormalities of cervical cytological results among HIV-1-Infected women in Rochester, New York. **Journal of Infectious Diseases**, v. 194, p. 428–434, 2006.

[39] BRUNO, A.; SERRAVALE, K.; TRAVASSOS, A. G.; LIMA, B. G. C. Genotype distribution of human papillomavirus in women from the state of Bahia, Brazil. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 36, p. 416-422, 2014.

[40] COSER, J., et al. Cervical human papillomavirus infection and persistence: a clinic-based study in the countryside from South Brazil. **Infectious diseases**, v. 20, p. 61-68, 2016.

[41] MANE, A., et al. HPV Genotype Distribution in Cervical Intraepithelial Neoplasia among HIV-Infected Women in Pune, India. **PLoS ONE**, v. 7, p. 1-9, 2012.

[42] CASTELLSAGUÉ, X., et al. Human papillomavirus detection in cervical neoplasia attributed to 12 high-risk human papillomavirus genotypes by region. **Papillomavirus Research**, v. 2, p. 61-69, 2016.

[43] XU, H., et al. Diagnostic accuracy of high-risk HPV genotyping in women with high-grade cervical lesions: evidence for improving the cervical cancer screening strategy in China. **Oncotarget**, p. 1-9, 2016.

[44] MASSAD, L. S., et al. Association of cervical precancer with human papillomavirus types other than 16 among HIV co-infected women. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, p. 1-6, 2016.

[45] ZHANG, R.; HE, Y.; CHEN, M.; et al. Diagnosis of 25 genotypes of human papillomaviruses for their physical statuses in cervical precancerous / cancerous lesions : a comparison of E2 / E6E7 ratio-based vs . multiple E1-L1 / E6E7 ratio-based detection techniques. , p. 1–16, 2014.

[46] MADDEDU, G., et al. HPV infection in HIV-positive females: the need for cervical cancer screening including HPV-DNA detection despite successful HAART. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 18, p. 1277-1285, 2014.

[47] CAMARGO, M.; LEON, S. C. S.; MUNOZ, M.; et al. Human papillomavirus detection in women with and without human immunodeficiency virus infection in Colombia. , v. 14, n. 1, p. 1–10, 2014.

[48] HEARD, I.; POTARD, V.; FOULOT, H.; et al. High rate of recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after surgery in HIV-positive women. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 39, p. 412-418, 2005.

[49] TATE D. R.; ANDERSON R. J.; Recrudescence of cervical dysplasia among women who are infected with the human immunodeficiency virus: a case-control analysis. **Am J Obstet Gynecol**, v. 186, p. 880-882, 2002.

[50] FREGA, A. et al. Follow-up of High-grade Squamous Intra-epithelial Lesions (H-SILs) in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-positive and Human Papillomavirus (HPV)-positive Women. Analysis of Risk Factors. **Anticancer research**, v. 26, p. 3167–3170, 2006.

[51] DENNY, L., et al. Human papillomavirus infection and cervical disease in human immunodeficiency virus-1-infected women. **Obstet Gynecol**, v. 111, p. 1380–1387, 2008.

[52] ZEIER, M. D., et al. Combination antiretroviral therapy reduces the detection risk of cervical human papilloma virus infection in women living with HIV. **AIDS**, v. 29, p. 59-66, 2015.

[53] LEHTOVIRTA P, PAAVONEN J, HEIKINHEIMO O. Risk factors, diagnosis and prognosis of cervical intraepithelial neoplasia among HIV-infected women. **Int J STD AIDS**, v. 19, p. 37-41, 2008.

[54] RAMOGOLA-MASIRE, D., et al. Subtype Distribution of Human Papillomavirus in HIV-Infected Women With Cervical Intraepithelial Neoplasia Stages 2 and 3 in Botswana. **International Society of Gynecological Pathologists**, v. 30, p. 591-596, 2011.

Capítulo III

Conclusão Geral

Em conclusão, nossos resultados mostram uma alta prevalência dos tipos HPV16 e HPV56 entre as amostras analisadas, evidenciando a importância de incluir o tipo 56 nas vacinas de HPV. Uma vez que o genótipo 56 foi o mais prevalente, o monitoramento dos pacientes infectados pelo HPV 56 poderia prevenir o câncer cervical e contribuir para um melhor prognóstico para a infecção pelo HPV. Os resultados também corroboram a literatura uma vez que a carga viral do HIV e a presença de lesões foram estatisticamente significativas, confirmando a importância de monitorar pacientes coinfectadas com HIV/HPV, com alta carga viral do HIV.

Anexos

7962787: Acknowledging Receipt

The Scientific World Journal <ahmed.khaled@hindawi.com>

qua 01/02/2017 09:11

Caixa de Entrada

Para:rodolfo_mb@hotmail.com <rodolfo_mb@hotmail.com>;

Cc:ahmed.khaled@hindawi.com <ahmed.khaled@hindawi.com>; marinacarrara@gmail.com <marinacarrara@gmail.com>; bru.stuqui@gmail.com <bru.stuqui@gmail.com>; patimelli@gmail.com <patimelli@gmail.com>; smquintana64@gmail.com <smquintana64@gmail.com>; carol.unespbio@yahoo.com.br <carol.unespbio@yahoo.com.br>; joseantoniocordeiro70@gmail.com <joseantoniocordeiro70@gmail.com>; macal131@gmail.com <macal131@gmail.com>; paolaprovazzi@gmail.com <paolaprovazzi@gmail.com>; rahalp@yahoo.com.br <rahalp@yahoo.com.br>;

Dear Dr. Miglioli Badial,

The Research Article titled "DETECTION AND GENOTYPING OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV) AND ITS RELATIONSHIP WITH THE PRESENCE OF CERVICAL LESIONS IN WOMEN COINFECTED WITH HIV," by Rodolfo Miglioli Badial, Marina Carrara Dias, Bruna Stuqui, Patricia Melli, Silvana Maria Quintana, Caroline Measso do Bonfim, José Antonio Cordeiro, Marilia Calmon, Paola Trabulsi and Paula Rahal has been received and assigned the number 7962787.

All authors will receive a copy of all the correspondences regarding this manuscript.

Thank you for submitting your work to The Scientific World Journal.

Best regards,

Ahmed Khaled
Editorial Office
Hindawi
http://www.hindawi.com