

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Tese

**Infecção por HPV e polimorfismo dos genes *TP53* e *MDM2*
em mulheres HIV positivas e negativas**

Ludmila Gonçalves Entiauspe

Pelotas, 2013

LUDMILA GONÇALVES ENTIAUSPE

Infecção por HPV e polimorfismos nos genes *TP53* e *MDM2* em mulheres HIV positivas e negativas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Biotecnologia).

Orientadora: Fabiana Kömmling Seixas

Coorientador: Mariângela Freitas da Silveira

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

E61i

Entiauspe, Ludmila Gonçalves

Infecção por HPV e polimorfismos nos genes da *TP53* e *MDM2* em mulheres HIV positivas e negativas / Ludmila Gonçalves Entiauspe. – 129f. – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2013. – Orientador Fabiana Kömmling Seixas ; co-orientador Mariângela Freitas da Silveira

1.Biotecnologia. 2.Epidemiologia. 3. Papilomavírus humano. 4.Câncer cervical. 5.Vírus da imunodeficiência humana. 6.p53. 7.MDM2. I.Seixas, Fabiana Kömmling. II.Silveira, Mariângela Freitas da. III.Título.

CDD: 616.9792

Banca examinadora:

Prof. Dra. Marta Gonçalves Amaral, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Sibele Borsuk, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Helena Strelow Thurow, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Mariângela Freitas da Silveira, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Fabiana Kömmling Seixas, Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

À minha orientadora, Dra. Fabiana Seixas, pela oportunidade de trabalhar durante três anos sob sua orientação, por acreditar em mim e na importância que o tema desta tese representa, pela paciência ao ouvir minhas inseguranças, típicas daqueles que passam por este processo, por me auxiliar a resolver as dificuldades encontradas, sobretudo de natureza metodológica.

À minha co-orientadora Dra. Mariângela da Silveira, por ampliar meus conhecimentos, por permitir livre acesso pelo ambulatório de Ginecologia, pela ajuda no encaminhamento e orientação às pacientes, pelo auxílio nos estudos epidemiológicos e análises estatísticas, e pelo profissionalismo que tanto admiro.

À Dra. Sibeles Borsuk e ao Dr. Alan McBride, os quais foram muito generosos em suas intervenções durante o processo de qualificação desta tese. Seus comentários geraram perspectivas que talvez não existissem sem estas contribuições.

Ao Dr. Tiago Collares, por abrir as portas do Grupo de Pesquisa em Oncologia Molecular e Celular, pela credibilidade empreendida, pelas sugestões indispensáveis e apoio empregado ao longo desta jornada.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e do Departamento Materno-Infantil da Faculdade de Medicina da UFPel, pelos ensinamentos adquiridos, os quais foram de extrema importância para a realização desta tese.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e do Departamento Materno-Infantil da Faculdade de Medicina da UFPel, pela solicitude e ajuda dispensadas.

Às alunas do curso Graduação em Medicina e em Biotecnologia, por me auxiliarem nas coletas e aplicação dos questionários.

Aos queridos colegas dos Laboratórios de Genômica Funcional e Embriologia Molecular e Transgenese Animal: Samuel, Virgínia, Karine, Eduarda, Elisa, Helena, Vinícius, Cristian, Tatiana e Wladimir, não apenas pela ajuda dispensada, mas também pelos momentos alegres que compartilhamos dentro e fora dos laboratórios.

Aos estagiários dos Laboratórios de Genômica Funcional e Embriologia Molecular e Trânsгенese Animal: Emily, Fernanda, Fernando, Stéphanie, Ruan, pelo espírito de grupo, amizade e sentido de entreajuda, características que me asseguram de que serão brilhantes profissionais no Mundo da Biotecnologia.

Aos meus pais e minhas irmãs, por todo amor, carinho e apoio ao longo desta caminhada, por vibrarem comigo a cada etapa concluída, pelo abraço nos momentos difíceis, por sempre estarem presentes na minha vida.

Ao Diego pelo incentivo, paciência, carinho, compreensão, e por sempre aliviar a tensão com momentos divertidos e palavras de carinho.

E agradeço especialmente às pacientes, pedra fundamental para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!!

“A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar...”

Eduardo Galeano

Resumo

ENTIAUSPE, Ludmila Gonçalves. **Infecção por HPV e polimorfismos nos genes *TP53* e *MDM2* em mulheres HIV positivas e negativas**. 2013. 129f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Estimativas mostram que cerca de 80% das mulheres sexualmente ativas estarão infectadas pelo Vírus do Papiloma Humano (HPV) em algum momento de suas vidas, o que DNA-HPV tem sido encontrado em 99,7% dos casos de câncer cervical (CC). Assim, vários fatores podem contribuir para o desenvolvimento do CC, incluindo coinfeções como o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), bem como fatores genéticos, incluindo os polimorfismos nas proteínas p53 e MDM2. Alguns autores relacionam um maior risco ao desenvolvimento de CC em mulheres infectadas com genótipos oncogênicos do HPV e que apresentam polimorfismo do gene supressor de tumor *TP53* (SNP Arg72Pro). A proteína MDM2 apresenta um papel importante na regulação da p53, e assim como o SNP Arg72Pro da p53, o SNP309 da MDM2 (substituição de T por G) também pode favorecer o desenvolvimento de CC quando associado a genótipos de HPV de alto risco. O presente trabalho objetivou conhecer o grau da extensão de infecção pelo HPV e identificação de seus genótipos, frequência do SNP Arg72Pro e MDM2 SNP309 e associação ao risco de CC, na população feminina HIV positiva e negativa residente em Pelotas. Foi observada uma prevalência de infecção por HPV em 30% no grupo HIV negativo e 68% no grupo HIV positivo. O genótipo de HPV mais prevalente no grupo HIV negativo foi o HPV-16, e HPV-6 no grupo HIV positivo. Nas HPV positivas, o genótipo Arg72Arg foi o mais prevalente em ambos os grupos, e o SNP309 TT para o grupo HIV negativo e TG para HIV positivo. Os resultados encontrados mostram que futuros estudos em populações maiores são necessários para um melhor entendimento destes SNPs em mulheres infectadas por HPV.

Palavras-chave: HPV. p53. Arg72Pro. MDM2. SNP309. Câncer Cervical. HIV.

Abstract

ENTIAUSPE, Ludmila Gonçalves. **Infecção por HPV e polimorfismos nos genes *TP53* e *MDM2* em mulheres HIV positivas e negativas** 2013. 129f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Estimates show that approximately 80% of sexually active women will be infected by the Human Papillomavirus (HPV) in some point of their life course, and HPV DNA has been found in 99,7% of cervical cancer (CC) cases. Thus, several factors may contribute to CC development, including co-infections with Human Immunodeficiency Virus (HIV), as well as genetic factors, including *TP53* and *MDM2* polymorphisms. Some authors have associated CC development risk, among women infected with oncogenic HPV strains, with the Arg72Pro *TP53* SNP. The MDM2 protein plays an important role in p53 protein regulation and, thus, a MDM2 SNP referred as SNP309 may also be implicated in CC risk in association with high-risk HPV genotypes. The present work aimed at determining the frequencies of HPV infection and identification of its genotypes, as well as the frequencies of the SNPs Arg72Pro and SNP309 and their associations with CC risk in female HIV-positive and negative populations in the city of Pelotas. It has been observed a prevalence of HPV infection of 30% among HIV-negative women, and 68% in the positive group. The HPV-16 genotype was the most prevalent in the HIV-negative group, and HPV-6 in the positive group. Among HPV-positive women, the *TP53* Arg/Arg genotype was the most prevalent in both HIV groups, and the SNP309 TT genotype was the most prevalent in the HIV negative group, and the TG genotype in the positive group. These findings suggest that future investigations in larger populations are necessary – and of interest – to better understand the potential roles of these SNPs in HPV infected women.

Keywords: HPV. p53. Arg72Pro. MDM2. SNP309. Cervical Cancer. HIV.

Lista de Tabelas

ARTIGO 1 - Comparação entre dois métodos de identificação molecular para Papilomavírus Humano

Tabela 1	46
Tabela 2	47
Tabela 3	48

ARTIGO 2 - High prevalence of oncogenic HPV genotypes found in women from Brazil

Tabela 1	63
Tabela 2	65
Tabela 3	66

ARTIGO 3 - Uncommon non-oncogenic HPV genotypes prevalence, *TP53* and *MDM2* genes polymorphisms in Brazilian HIV-positive women

Tabela 1	92
Tabela 2	94

Lista de Figuras

ARTIGO 2 - High prevalence of oncogenic HPV genotypes found in women from brazil

Figura 1	67
----------------	----

Lista de abreviaturas

AIDS - *Acquired Immunodeficiency Syndrome*

Arg – Arginina

ASCUS – Células escamosas atípicas de significado indeterminado

CC – Câncer Cervical

CD4 - *Cluster of Differentiation 4*

CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CEPAS – Comitê de Ética em Pesquisa na Área da Saúde

CT - *Chlamydia trachomatis*

DNA - *Deoxyribonucleic Acid*

DST – Doença Sexualmente Transmissível

E1 – E7 - *Early genes*

G – Guanina

HC – *Hybrid capture*

HIV – *Human Immunodeficiency Virus*

HPV – *Human Papilloma Virus*

HR-HPV – HPV High-risk

HSIL – Lesão intraepitelial escamosa de alto grau

IARC - *International Agency for Research on Cancer*

IC – Intervalo de confiança

ICTV – *International Committee on Taxonomy of Viruses*

INCA – Instituto Nacional do Câncer

Kb – Quilo bases

L1 – L2 – *Late genes*

LCR – *Long control region*

LR-HPV – *Low-risk HPV*

LSIL - *Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion*

MDM2 - *Mouse Double Minute 2*

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

NIC – Neoplasia Intraepitelial Cervical
nPCR – *Nested Polimerase Chain Reaction*
ORI – Origem de replicação
ORF – *Open reading frame*
p53 – *Tumor Protein p53*
pb – Pares de bases
PCR - *Polymerase Chain Reaction*
pRb – *Retinoblastoma Protein*
Pro – Prolina
RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*
RR – *Relative risk*
SIL – *Squamous Intraepithelial Lesion*
SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*
SV40T - *Simian Vacuolating Virus 40 T Antigen*
T – Timina
TP53 - *Tumor Protein p53*
UICC – União Internacional Contra o Câncer
URR – *Upstream regulatory region*
UV - Ultravioleta
µL – Microlitros
 χ^2 - Qui-quadrado
°C – Grau Celsius

Sumário

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA	18
2.1 O Papilomavírus humano (HPV)	18
2.1.1 Genoma e expressão gênica do HPV	20
2.1.2 Ciclo Biológico do HPV	22
2.1.3 Epidemiologia do HPV	23
2.1.4 Coinfecção HPV/HIV	24
2.2 O Câncer cervical.....	26
2.3 TP53 do códon 72.....	27
2.4 A oncoproteína MDM2	29
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo Geral	31
3.2 Objetivos Específicos	31
4. ARTIGO 1	32
COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR PARA PAPILOMAVÍRUS HUMANO	33
Resumo.....	34
Abstract.....	35
1. Introdução	36
2. Métodos	38
2.1. Amostra.....	38
2.2. Cálculo da amostra, desfecho e análise estatística	38
2.3. Coleta e extração do material genômico.....	39
2.4. Detecção do HPV pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR)	39
2.5. Detecção do HPV pelo método de reação em cadeia da polimerase nested (nPCR).....	39
3. Resultados	40
4. Discussão.....	40
5. Conclusão	42
Referências.....	42
5 ARTIGO 2	49

HIGH PREVALENCE OF ONCOGENIC HPV GENOTYPES FOUND IN WOMEN FROM BRAZIL.....	50
Abstract.....	51
1. Introduction	52
2. Subjects, material and methods	53
2.1. <i>Study population</i>	53
2.2 <i>Sample collection and processing</i>	53
2.3. <i>HPV genotyping</i>	54
2.4. <i>Statistical analyses</i>	55
3. Results	55
4. Discussion.....	56
References.....	59
6 ARTIGO 3	68
UNCOMMON NON-ONCOGENIC HPV GENOTYPES PREVALENCE, <i>TP53</i> AND <i>MDM2</i> GENES POLYMORPHISMS IN BRAZILIAN HIV-POSITIVE WOMEN	69
Abstract.....	70
1. Introduction	71
2. Material and methods.....	73
2.1. <i>Study type, characterization and sample size</i>	73
2.2 <i>Logistics</i>	73
2.3. <i>Sample collection and DNA extraction</i>	74
2.4. <i>TP53 gene polymorphism analisys</i>	74
2.5. <i>MDM2 SNP309 analisys</i>	75
2.6 <i>HPV DNA detection by PCR</i>	75
2.7. <i>Sequencing of the PCR products</i>	76
2.8. <i>Sequences analysis</i>	76
2.9. <i>Results analyses</i>	76
3. Results	77
4. Discussion.....	78
5. Conclusion	84
References.....	85
7 CONCLUSÕES	95

REFERÊNCIAS96
ANEXOS

1 INTRODUÇÃO

O Papilomavírus Humano (HPV) é responsável por causar doença sexualmente transmissível (DST) tipo-específica, que infecta a pele e as mucosas, causando lesões tanto benignas como malignas. Esta DST frequentemente acomete a população sexualmente ativa, entre 15 e 49 anos de idade (MS, 2012). A infecção pelo HPV é considerada a causa principal dos casos de câncer cervical (99,7%) e de uma fração dos casos de câncer vulvar (40%), vagina (70%), anal (84% em ambos os sexos) e peniano (47%) (CDC, 2012). O câncer cervical (CC) é o segundo tipo de câncer mais frequente e a terceira causa de morte por câncer na população brasileira, apenas o câncer de mama e de pele não melanoma possuem índices mais elevados. Dados sobre incidência e mortalidade por câncer cervical do Instituto Nacional de Câncer (INCA) apresentou para os anos de 2011 e 2012, uma estimativa de 17.540 novos casos e de 4.800 óbitos (MS, 2011).

Embora a infecção pelo HPV seja considerada a causa necessária para o desenvolvimento de CC, apenas a presença do vírus não é suficiente. Estudos epidemiológicos reportaram que o desenvolvimento desta malignidade é resultado da associação entre a persistência da infecção por HPV com fatores comportamentais, sociodemográficos e genéticos (CASTELLSAGUÉ & MUÑOZ, 2003; DA SILVA et al., 2006, WANG et al., 2010). Além disso, coinfeções causadas pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e pela bactéria *Chlamydia trachomatis* (CT) estariam envolvidas como cofatores, atuando como adjuvantes do processo neoplásico (DELUCA et al., 2011; MUCHIRI et al., 2012).

O polimorfismo do gene supressor de tumor *TP53* no códon 72 (SNP Arg72Pro) tem sido investigado extensivamente para associação com vários cânceres em todo o mundo (DE LIMA et al., 2006). Em células infectadas pelo HPV, ocorre a degradação da proteína p53, alterando sua atividade nos processos de regulação da transcrição, ativação da telomerase, e apoptose, acarretando em um descontrole do ciclo celular (HOWIE et al., 2009). Autores têm demonstrado que o genótipo homozigoto da p53 Arginina (Arg) confere maior risco para o

desenvolvimento de CC quando comparado ao genótipo homozigoto Prolina (Pro) (STOREY et al., 1998; JIANG et al., 2009).

O gene MDM2 (abreviatura de “*murine double minute 2*”) atua como um inativador transcricional da p53. O polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) no promotor do gene MDM2, o SNP309, resulta em um maior nível de mRNA MDM2 e da proteína MDM2 e consequente diminuição da via p53 (BOND et al., 2004). O MDM2 SNP309 ocorre em uma frequência relativamente alta na população em geral, e foi mostrado que pode apresentar associação com CC mediado por HPV (NUNOBIKI et al., 2010).

A prevenção primária de CC pode ser realizada com sucesso através de programas de conscientização e controle da infecção pelo HPV. Espera-se que se uma mulher, mesmo após os 30 anos de idade, realizar o rastreamento para a infecção por HPV, e o tratamento quando necessário for fornecido, o risco para CC reduzirá significativamente (UICC, 2010). Portanto, é cada vez maior o interesse na detecção e identificação do HPV na infecção genital e em lesões precoces do colo uterino, na perspectiva de uma atuação mais ampla em nível de prevenção primária. Um método de diagnóstico mais específico possibilitaria uma detecção e tratamento precoces mais efetivos, diminuindo assim as chances do desenvolvimento das lesões mediadas pelo HPV, visto que a evolução de lesões pré-cancerosas para doença invasiva é lenta (WHO, 2006).

A presente tese encontra-se dividida em, primeiramente, uma revisão bibliográfica acerca do tema: HPV, TP53, MDM2 e câncer cervical, seguida por três artigos, os quais foram desenvolvidos ao longo do curso de Doutorado em Biotecnologia. O primeiro artigo trata-se de um estudo de comparação entre dois métodos de identificação para HPV; o segundo artigo relata a prevalência de HPV mediante mulheres soronegativas para HIV, e o terceiro artigo aborda a análise da prevalência de HPV, frequência de polimorfismo nos genes *TP53* e *MDM2* em um grupo de mulheres HIV positivas. Além destes, o curso de Doutorado possibilitou a confecção e publicação de um livro, intitulado “Risco Biológico: Boas Práticas e Biossegurança”.

2 REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA

2.1 O Papilomavírus Humano (HPV)

O papilomavírus Humano (HPV) é responsável por uma das doenças sexualmente transmitidas mais comuns em ambos os sexos em todo o mundo, com taxas de prevalência variando de acordo com cada população estudada e localização geográfica (DE SANJOSÉ et al., 2007). A maioria das infecções por HPV são transitórias, e alguns estudos mostraram que a maioria dos indivíduos sexualmente ativos está exposta a infecção por HPV em algum momento de suas vidas (TROTIER & FRANCO, 2006). Assim, a infecção por HPV é mais prevalente em adultos jovens no início de suas vidas sexuais, com um subsequente declínio nos índices de prevalência com o aumento da idade, provavelmente como resultado do desenvolvimento de uma resposta imune contra o vírus e também redução das atividades sexuais (FERNANDES et al, 2009; CHAN et al., 2010).

Os HPVs podem ser divididos em dois grupos de tropismo: aqueles que infectam a superfície queratinizada da pele, causando verrugas comuns, e aqueles que infectam a mucosa da boca, garganta, trato respiratório e anogenital (MISTRY et al., 2008). Alguns HPVs da mucosa estão associados com as verrugas genitais, enquanto outros têm sido associados com lesões intraepiteliais pré-malignas e malignas de diferentes graus, sendo o principal fator de risco para o desenvolvimento de câncer cervical invasivo (BOSCH et al., 2010). No entanto, poucos indivíduos infectados por HPV progredirão a esta malignidade: a maioria elimina o vírus sem desenvolver alguma manifestação clínica (MUÑOZ et al., 2006).

Os HPVs estão classificados em genótipos, sendo considerado um novo genótipo de HPV aquele que tiver seu genoma completo clonado e apresentar mais de 10% de diversidade da ORF L1 de genótipos de HPV anteriormente descritos. Diferenças entre 2% e 10% de homologia definem um subtipo, e menos de 2% uma variante (DE VILLIERS, 2004). Atualmente estão descritos mais de 100 genótipos diferentes de HPV. Destes, cerca de quarenta genótipos são transmitidos sexualmente, dos quais 15 são capazes de desenvolver câncer genital (MUÑOZ et al., 2003; DE VILLIERS et al., 2004).

De acordo com sua capacidade de transformação neoplásica, os papilomavírus podem ser classificados em baixo ou alto risco (MUÑOZ et al., 2006; NAUD et al., 2006). Os genótipos de baixo risco (LR-HPV) estão relacionados principalmente às manifestações benignas do trato genital, como a verruga genital e lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), e raramente estão associados a lesões pré-malignas e malignas. Os genótipos relacionados comumente as lesões benignas de HPV são 6, 11, 42, 43, 44, sendo os HPVs 6 e 11 encontrados em mais de 97% das verrugas genitais (COX, 2006). Outra patologia associada a estes genótipos é a papilomatose respiratória recorrente (PRR), também conhecida como papilomatose laríngea juvenil (LINHARES E VILLA, 2006). A lesão intraepitelial de alto grau (HSIL) e carcinoma invasivo do colo uterino estão fortemente associados aos genótipos de alto risco oncogênico (HR-HPV), e também encontram-se relacionados a outros cânceres anogenitais, cabeça e pescoço, e o carcinoma epidermóide na boca e orofaringe (ANG et al., 2010). Os oito genótipos mais comuns no mundo são HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 e 58, responsáveis por 80% dos casos de CC, sendo HPV 16 e 18 somados, os causadores de 70% destes casos (WHO, 2010).

Os HPVs também são classificados pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV) como pertencentes à Família Papillomaviridae, divididos em cinco gêneros identificados por letras gregas, os gêneros por sua vez dividem-se em espécies, identificadas por números arábicos baseados na identificação das sequências de nucleotídeos em seus genomas, além suas propriedades filogenéticas e potencial patológico (DE VILLIERS et al., 2004). O gênero *Alphapapillomavirus* está associado com infecções na mucosa oral e anogenital, abrangendo um grupo de HR-HPV responsáveis por praticamente todos os casos de CC e uma pequena porção de outros tipos de câncer genitais (STANLEY, 2010). O gênero Alfa compreende três grupos principais, onde todos os genótipos de HPV com potencial oncogênico estão reunidos, formando um grupo de alto risco composto de cinco grupos de espécies: α -5, α -6, α -7, α -9, e α -11, sendo α -9 abrangendo as espécies mais importantes, composta quase que totalmente de genótipos oncogênicos, onde o principal é o HPV 16 (DE VILLIERS et al., 2004).

2.1.1 Genoma e expressão gênica HPV

O HPV é um vírus pequeno e não envelopado, o qual contém um genoma DNA circular de fita dupla, protegido por um capsídeo com simetria icosaédrica, formado por dois tipos de proteínas. O capsídeo é composto por 72 capsômeros, e cada um destes são compostos por cinco unidades monoméricas de 55kDa, que juntas foram um pentâmero correspondente a principal proteína do capsídeo: L1. O pentâmero L1 está distribuído formando uma rede intra e interpentamérica, a qual estabiliza o capsídeo. A proteína L2 é um componente secundário do capsídeo viral, com 75kDa localizados dentro do vírion. Para a montagem do capsídeo viral, os pentâmeros se unem à cópias de L2, o qual fecha o centro de cada capsômero pentavalente. Assim, cada vírion contém 72 cópias de L1, o principal componente do capsídeo, e um número variável de cópias de L2, formando uma partícula de aproximadamente 55nm de diâmetro (CONWAY & MEYERS, ZUR HAUSEN, 2009).

O genoma do HPV apresenta cerca de 8 mil pares de bases, e aproximadamente 10 ORFs (*open reading frames*), as quais podem ser divididas em três regiões: região reguladora *upstream* (URR) ou região de longo controle (LCR), região E (do inglês “*Early*”) e região L (do inglês “*Late*”), sendo as duas últimas assim denominadas devido ao momento em que se manifestam durante o processo de replicação do vírus. A região E apresenta seis genes (E1, E2, E4-E7) que codificam para proteínas não estruturais, envolvidas na replicação do DNA e na transformação celular, enquanto que a região L apresentam dois genes (L1 e L2), responsáveis por codificar para as proteínas formadoras do capsídeo, as quais são expressas somente em células produtivamente infectadas (MUÑOZ *et al.*, 2006). A região LCR possui aproximadamente 1kb, e embora não apresente ORF, possui todos os elementos *cis* necessários para a regulação da expressão gênica, replicação do genoma e formação do capsídeo viral, atuando na regulação da transcrição dos genes virais E6 e E7. A LCR representa 10% do genoma e é a região menos conservada entre os papilomavírus (ZHENG & BAKER, 2006).

O genoma do HPV pode ser encontrado na forma episomal, ou seja, dentro do núcleo da célula hospedeira, porém não ligado ao seu DNA, em células infectadas de mulheres com cérvix normal e alterada. No entanto, a maioria das

lesões de alto grau e em CC apresentam o genoma do HPV na forma integrada ao genoma do hospedeiro. Para que ocorra a integração do genoma do HPV no DNA do hospedeiro, o DNA circular é frequentemente rompido na ORF E2, a qual atua como repressor transcricional das ORFs responsáveis pela transformação celular maligna - E6 e E7, resultando no aumento da expressão e estabilização destas. Parte da E2 e ORFs adjacentes a ela - E4, E5 e parte da L2, são eliminadas após a integração (ZUR HAUSEN, 2002; HOWIE, 2009; BELLANGER et al., 2011).

Os genótipos de alto risco do HPV desenvolvem alterações no metabolismo da célula diferentemente dos genótipos de baixo risco. Tais diferenças são responsáveis por induzir a transformação celular, proliferação e imortalização das células, pois ambas interferem nos dois maiores mecanismos de controle do ciclo celular, os produtos dos genes supressores de tumor *TP53* e *RB* (p53 e pRb, respectivamente) (LONGWORTH E LAIMINS, 2004; MUÑOZ et al., 2006).

A proteína p53 conduz a célula à apoptose na fase S do ciclo celular. Em células infectadas pelo HPV, a proteína E6 liga-se ao gene supressor de tumor p53 e promove sua degradação, através de um sistema ubiquitina proteolítica, acarretando em um descontrole do ciclo celular (MÜNGER et al., 2004). Formas desfosforiladas de pRb formam complexos com os fatores de transcrição E2F/DP1, os quais estão vinculados aos promotores dos genes envolvidos na progressão ou apoptose da fase S do ciclo celular, e tal complexo resulta na repressão da transcrição (LONGWORTH e LAIMINS, 2004). A função da proteína E7 ocorre durante a transformação celular, através de interações que inativam a pRb e outras proteínas relacionadas a esta. Como consequência, o fator de transcrição E2F é liberado do complexo pRb-E2F, levando a ativação transcricional de várias proteínas envolvidas no processo de replicação do DNA (MACIAG e VILLA, 1999; MUÑOZ et al., 2006).

A presença destas proteínas parece ser a principal causa da instabilidade cromossômica de células infectadas por HPV-HR, resultando em mutações, além de também favorecer a integração de DNAs estranhos ao genoma da célula hospedeira (HOWIE, 2009). Em uma infecção pelo HPV não oncogênico, a função dos genes E6 e E7 é o de fornecer uma vantagem para o aumento de partículas virais no

hospedeiro, possivelmente através da expansão do *pool* celular pela indução de proliferação, ou providenciando um meio intracelular apropriado para uma replicação eficaz do DNA (HOWLEY et al., 1991). Estudos têm especulado que a principal função da proteína E6 seja manter o ciclo de vida produtivo viral, facilitando a replicação do vírus (LONGWORTH e LAIMINS, 2004).

2.1.2 Ciclo Biológico do HPV

O ciclo biológico do HPV está relacionado à diferenciação da célula hospedeira infectada, o queratinócito, com a produção de partículas virais maduras restritas as células supra basais diferenciadas. Acredita-se que a infecção pelo HPV ocorre através de micro lesões do epitélio, o qual expõe as células da camada basal para a entrada do vírus. O receptor para a entrada do HPV nas células é ainda desconhecido, no entanto, o sulfato de heparina realiza a intermediação para a fixação inicial do vírus na célula (LONGWORTH e LAIMINS, 2004).

A replicação viral ocorre em três etapas. A primeira é denominada Fase de Estabelecimento, onde o HPV infecta as células do estrato basal, penetrando nestas através de micro lesões. Neste momento, o genoma viral é liberado no interior do núcleo e mantém sua conformação circular (a qual geralmente é mantida durante todo o ciclo replicativo). Inicia-se então a síntese das proteínas virais iniciais E1 e E2, as quais formam um complexo que se liga em sequências da origem de replicação viral (ORI), e atua no recrutamento de polimerases e proteínas acessórias, dando início à replicação do genoma, obtendo de 20 a 100 cópias (HUBERT e LAIMINS, 2002; LONGWORTH e LAIMINS, 2004).

Ainda no estrato basal, inicia-se a segunda etapa ou Fase de Manutenção. Esta etapa é um pré-requisito para a manutenção do ciclo viral. A expressão de E6, E7, E1, E2 é necessária para a manutenção episossomal. E1 e E2 iniciam a replicação do DNA viral, enquanto que E6 e E7 atuam como reguladores do ciclo celular, para garantir a replicação em longo prazo (DOORBAR, 2005). A proteína E2 é, provavelmente, o principal regulador, pois tem a capacidade de controlar - tanto positiva como negativamente, os promotores virais que regulam a expressão de E6, E7 e E1, bem como a si própria (FRAZER, 2009). Após esta fase de estabelecimento, o DNA viral é replicado concomitantemente ao DNA hospedeiro, e

genomas virais são distribuídos para as células filhas. As proteínas E6 e E7 conduzem à transformação celular, induzindo que a célula tenha um ciclo de vida mais rápido e divida-se com maior frequência. No entanto, nos queratinócitos diferenciados da camada supra basal do epitélio, o vírus muda para o modo de replicação do DNA, e os genes E1, E2, E5, E6, e E7 contribuem para a manutenção do genoma viral e induzem a proliferação celular, síntese de proteínas do capsídeo e montagem da partícula viral, aumentando o número de células infectadas por HPV no epitélio, dando início à Fase Produtiva (MUÑOZ, 2006; HAMID et al., 2009).

A Fase Produtiva ocorre à medida que as células infectadas por HPV deixam a camada basal, e sofrem a diferenciação. A ordem da expressão dos genes dos HPVs constitui uma estratégia importante para manter a infecção por maior tempo, mas também gera algumas dificuldades para o vírus. Assim, o vírus precisa forçar o ciclo da célula, o que permite a replicação produtiva durante o processo de diferenciação celular. A proteína E7 é a responsável por garantir este processo, através da inativação dos membros da família do retinoblastoma (pRB) (FRAZER, 2009). Ao contrário da Fase de Manutenção, onde a produção de cópias virais é baixa, ocorre a produção de 50-200 cópias para vários milhares de cópias por célula. Esta estratégia de replicação adotada pelo HPV reduz a expressão de proteínas em células indiferenciadas e apenas intensifica a expressão das suas proteínas, em particular as proteínas L1 e L2. A liberação dos vírus ocorre nos queratinócitos localizados mais superficialmente, à medida que estes fenecem por apoptose (MUÑOZ *et al.* 2006). Os vírus liberados ficam imediatamente disponíveis para infectar um novo tecido, e sua localização na superfície do papiloma é de grande importância para que ocorra uma maior eficiência de contágio. Em células mais diferenciadas, as funções de replicação tornam-se um mecanismo de fuga da resposta imune (DOORBAR, 2005).

2.1.3 Epidemiologia do HPV

A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) é considerada uma infecção sexualmente transmissível (IST), detectada em até 40% da população sexualmente ativa entre os 15 e 49 anos de idade (MS, 2009). A alta prevalência, a

transmissibilidade e malignidade causada pelo HPV, principalmente em mulheres, representam um importante problema de saúde pública (WHO, 2006).

Estimativas mostram que aproximadamente 300 milhões de mulheres no mundo estejam infectadas por HPV, das quais 32% encontram-se infectadas pelo HPV 16 ou 18, ou ambos (DE SANJOSÉ et al., 2007). De acordo com o Ministério da Saúde, o Brasil é um dos líderes mundiais em incidência de HPV, onde a cada ano são registrados 137 mil novos casos da doença. Entretanto, embora a prevalência da infecção por HPV seja elevada, 90% dos casos de infecção são eliminados pelo próprio sistema imune em um período de até dois anos (MS, 2012). Na cidade de Pelotas, um estudo mostrou que no ano de 1992 houve uma cobertura para o rastreamento cervical de 65% em mulheres com idades entre 20-69 anos, e que no ano de 2000 esta cobertura aumentou para 72% (WHO, 2010).

Aproximadamente quatro décadas se passaram após o questionamento de um possível envolvimento do HPV no desenvolvimento do câncer cervical (CC), onde interesse pelo estudo sobre o HPV e sua maior malignidade passou a crescer amplamente (ZUR HAUSEN, 2002). Com a incorporação de novas técnicas moleculares, estudos epidemiológicos foram realizados ao longo destas décadas, e atualmente está bem estabelecido que alguns genótipos do HPV são fatores causais responsáveis por esta patologia. Foi também possível confirmar que a infecção persistente por um ou mais tipos de oncogênicos é um fator etiológico importante para o desenvolvimento de neoplasia intraepitelial cervical e a sua progressão para o CC (MUÑOZ et al., 2003).

2.1.4 Coinfecção HPV/HIV

De um modo geral, infecções do trato genital aumentam o risco de aquisição do HIV e outras DST em cerca de 10 vezes. Em um estudo de base populacional realizado com mulheres entre 15-49 anos de idade na cidade de Pelotas, o qual buscava identificar fatores associados a comportamentos de risco para adquirir DST/HIV, observou-se que o escore de risco foi significativamente maior em mulheres jovens, de baixa escolaridade, divorciadas ou separadas, e fumantes (SILVEIRA, BERIA et al., 2002).

A epidemia de HIV/AIDS é uma importante causa de mortalidade no mundo, e um terço das pessoas infectadas por HIV na América Latina vive no Brasil (UNAIDS, 2008). Na cidade de Pelotas (1990-2008) 520 mulheres foram diagnosticadas como portadoras do vírus HIV, dado este que cresceu a partir do ano 2000, com 411 casos somados no período de 2000 até junho de 2008 (MS, 2008). Devido à debilidade do sistema imune, mulheres infectadas pelo HIV apresentam uma maior prevalência de infecção por HPV e de lesões intraepiteliais (PALEFSKY, 2006), as quais se mostram como mais graves, com rápida progressão, difíceis de tratar e elevada taxa de recorrência (SOUZA et al., 2001). Nesta população, o CC invasivo tem comportamento mais agressivo, responde mal às terapias preconizadas e apresenta pior prognóstico (LEVI et al., 2004).

A chance de mulheres HIV positivas infectadas pelo HPV de desenvolverem neoplasia intraepitelial cervical (NIC) quando comparado as não portadoras de HIV é de 13,3 vezes (SOUZA et al., 2001), além de apresentarem um aumento de 100 vezes na incidência de carcinoma da vulva e do ânus, e um risco para o CC aumentado em 14 vezes (PALEFSKY, 2006). Além disso, foi constatado que a prevalência de anormalidades citológicas é mais alta nestas mulheres (FERNANDES et al., 2007), e que HIV positivas infectadas pelo HPV apresentavam a ocorrência de outras doenças sexualmente transmissíveis, em contraste ao grupo de mulheres soronegativas para o HIV (CAMPOS et al., 2005). No extremo sul do Brasil, foi observado que mulheres HIV positivas são significativamente mais susceptíveis à infecção por genótipos oncogênicos quando comparados às HIV negativas (ENTIAUSPE et al., 2010).

Aparentemente, a infecção por HIV exerce um papel oncogênico multifatorial no desenvolvimento do câncer cervical, através da interferência com a função imune e também na promoção direta do desenvolvimento da lesão. A proteína Tat do HIV-1 parece favorecer a proliferação celular, a qual regularia de forma positiva os genes E6 e E7 do HPV, responsáveis pela transformação celular maligna (BUONAGURO et al., 1994; NYAGOL et al., 2006). Dados recentes indicam que importantes alterações ocorrem no colo uterino de mulheres coinfectadas por HPV/HIV, sugerindo que a resposta imune parece ser regulada negativamente, exceto para a

RANTES (abreviatura para “*Regulated and normal T cell expressed and secreted*”), a qual tem sido encontrada aumentada (NICOL et al., 2008).

2.2 O Câncer Cervical

Estimativas mundiais relataram que, 85% dos 529.000 casos novos por ano de câncer de colo de útero em 2008, ocorreram em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, com taxas elevadas encontradas na América do Sul (GLOBOCAN, 2008). Neste período, cerca de 274.000 mulheres morreram da doença, onde 88% ocorreram em países em desenvolvimento, sendo registrados 31.400 óbitos na América Latina - 11 mil destes no Brasil, tornando CC uma das mais graves ameaças à vida das mulheres (WHO, 2006, GLOBOCAN, 2008).

O CC encontra-se como o segundo câncer mais frequente em mulheres no Brasil, e também como o segundo tipo de câncer mais frequente entre as idades de 15 e 44 anos. Para o ano de 2012, o Instituto Nacional do Câncer estimou que a incidência de câncer de colo uterino no Brasil será de 18.430, com um risco estimado de 17 casos para cada 100 mil mulheres. No estado do Rio Grande do Sul, o estimado é que 850 mulheres desenvolverão a doença. Estima-se também que para a capital do estado, Porto Alegre, haverá uma incidência de 150 casos de câncer de colo de útero a cada 100.000 mulheres (MS, 2012).

O HPV 16 tem sido apontado como o mais prevalente em estudos epidemiológicos, seguido principalmente pelo HPV-18, sendo estes encontrados em 70% dos casos de câncer de colo de útero no mundo (CLIFFORD et al., 2006; SCHIFFMANN et al., 2009). CASTELLSAGUÉ et al. (2006) realizaram um estudo multicêntrico de caso e controle com mulheres portadoras de adenocarcinoma e observaram que a prevalência de HPV nestes casos era de 87,4%, detectando o HPV 16 como o mais prevalente na América do Sul e no Norte da África, e o HPV 18 no Sudeste Asiático. MUNÓZ et al. (2006) em um estudo semelhante, encontraram o genótipo HPV-16 como o mais prevalente em todos os países incluídos no estudo, com taxas de infecção variando de 43,9% nas Filipinas a 72,4% no Marrocos. CLIFFORD et al. (2005) observaram a prevalência de genótipos de alto risco em 66,8% de mulheres que apresentavam diagnóstico citopatológico normal, percebendo que a frequência do HPV 16 foi duas vezes maior em todas as regiões

estudadas, com exceção da África sub-Saara, onde a taxa de HPV 35 foi igualmente comum. A América Latina encontra-se em segundo lugar no ranking desta infecção (18,8%), e estes genótipos juntos são os mais prevalentes, somando 4,3% (DE SANJOSÉ et al., 2007). No Brasil, 70,7% dos cânceres cervicais invasivos são atribuídos aos HPVs 16 ou 18 (WHO, 2010).

2.3 TP53 do códon 72

O gene *TP53* localiza-se no braço curto do cromossoma 17 (17p13.1), apresentando uma estrutura com 11 éxons e um tamanho de aproximadamente 20 kb, foi o primeiro gene supressor de tumor a ser identificado. Este gene codifica para fosfoproteínas nucleares de 53kDa, composta por 393 aminoácidos, e faz parte de uma família de genes altamente conservados, a qual inclui pelo menos outros dois membros: *TP63* e *TP73* (DE MOURA GALLO et al., 2005).

O *TP53* codifica para a proteína p53, descrita primeiramente no ano de 1979, em um estudo com células transformadas pelo vírus símio 40 (SV40), apresentando forte associação ao antígeno T, com elevados níveis de expressão em tumores e células alteradas (LANE e CRAWFORD, 1979). Esta proteína é expressa de forma inibida em células normais de quase todos os tecidos. Porém, é ativada frente a um dano do material genético celular, através da mobilização de outros genes do mecanismo de reparo, sendo assim, responsável por monitorar os estresses ocorridos nas moléculas de DNA, impedindo a célula de prosseguir com o processo de mitose até que este dano seja reparado, ou então, levando a mesma à apoptose (LOWE, 2009).

As mutações no gene *TP53* têm sido encontradas em quase todos os tipos de câncer em várias frequências e diferentes em sua natureza (OLIVIER et al., 2010). Nas células que apresentam inativação da proteína p53, a célula torna-se incapaz de detectar e restaurar possíveis danos ao DNA, dessa maneira, a divisão celular se mantém sem que ocorra um reparo. Em consequência a isto, a frequência das mutações, rearranjos cromossômicos e aneuploidias são aumentados, e o acúmulo destes eventos mutacionais possa ser causa encoberta para o desenvolvimento de um fenótipo neoplásico e provavelmente, no desenvolvimento de câncer (OLIVIER et al., 2010).

O polimorfismo do gene supressor de tumor p53, no códon 72 tem sido investigado extensivamente para associação com vários cânceres em todo o mundo (DE LIMA et al., 2006). O códon 72 pertencente ao éxon 4 codifica um aminoácido Arginina (CGC; Arg72) e um Prolina (CCC; Pro72), correspondendo à arginina/prolina (Arg72Pro) (TADA et al., 2001). O polimorfismo ocorre por simples substituição de uma base no códon que resulta em alteração estrutural da proteína p53 (THOMAS et al., 1999). Vários autores têm demonstrado que a presença de Arg72Arg confere maior risco de desenvolvimento de tumores, como em cânceres de bexiga (PANDITH et al., 2010), cérvix uterino (YE et al., 2010), mama (DUMAY et al., 2012), entre outros.

Em células infectadas pelo HPV, a proteína E6 relacionada ao câncer liga-se a proteína p53 e promove sua degradação, através de um sistema ubiquitina proteolítica, alterando a atividade da p53 nos processos de tumorigênese, regulação da transcrição, ativação da telomerase, e apoptose, acarretando um descontrole do ciclo celular (BEAUDENON & HUIBREGTSE, 2008). STOREY et al. (1998) demonstraram que pacientes os quais eram homozigotos para o alelo Arg apresentavam risco de desenvolver CC cerca de sete vezes maior que pacientes homozigotos para Pro. Isto sugere que não apenas a presença de infecção por HPV, mas uma diferença na estrutura da p53 possa ser um importante fator a ser considerado para carcinogênese cervical (BRENNAN e SYRJÄNEN, 2003). Isto também implica que a genotipagem dos alelos Arg72Pro em pacientes com lesão intraepitelial escamosa (SIL) possa permitir selecionar pacientes com alto risco para CC invasivo, visto que a SIL seja uma lesão pré-maligna a qual leva ao câncer invasivo (YAMASHITA et al., 1999).

Entretanto, em um recente estudo em amostras cervicais normais e com lesões de alto e baixo risco, não foi possível associar a presença do polimorfismo da p53 no códon 72 e a frequência dos alelos Arg e Pro com o aumento do risco para CC (NUNOBIKI et al. 2011). Estes dados sugerem que é improvável a associação entre polimorfismo da p53 no códon 72 com o desenvolvimento de neoplasias cervicais associadas ao HPV. Entretanto, é válido ressaltar que os resultados controversos encontrados a respeito da associação entre o polimorfismo da p53 e

câncer cervical possam ocorrer devido a diversos fatores, como diferenças no polimorfismo da *TP53* entre os grupos étnicos, tamanho da amostra, escolha do controle utilizado, e fonte de obtenção de DNA (HU et al., 2010).

2.4 A oncoproteína MDM2

A proteína MDM2 (abreviatura do inglês “*Murine double-minute 2 homolog*”) regula negativamente a p53, e encontra-se frequentemente super expressada em 10% dos casos de câncer. O mau funcionamento deste gene pode estar associado a um aumento na taxa de acumulação de erros genéticos (NUNOBIKI et al., 2010).

Em situações onde não há estresse celular, os níveis de expressão da p53 são regulados negativamente pela proteína MDM2, que codifica para uma proteína ubiquitina ligase (E3), orientando a p53 para a degradação proteossomal, assim atuando como um inativador transcricional deste supressor tumoral. Estudos têm demonstrado que um polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) no promotor do gene MDM2, o SNP309 (mudança de T para G no nucleotídeo 309 no primeiro íntron) aumenta a afinidade de ligação do ativador transcricional SP1, resultando em um maior nível de mRNA do gene MDM2 e da proteína MDM2, e consequente diminuição da via p53 (BOND et al., 2004; HU et al., 2007). A MDM2 pode também levar a uma estabilidade do genoma através de uma via independente da p53 (KRUSE, 2009).

Embora vários polimorfismos no MDM2 tenham sido observados, é o SNP309 o mais intensamente caracterizado. O alelo T é o alelo ancestral, mas a alta frequência do alelo G em muitas populações indica que a pressão seletiva favorece a variante G, fixando-o na população, apesar deste alelo ser uma variante de risco potencial para o câncer (ATWAL, 2007).

São poucos os estudos correlacionando MDM2 SNP309 a susceptibilidade ao câncer cervical, embora o SNP309 ocorra relativamente com alta frequência na população em geral e sua presença tenha sido associada com o aceleração da tumorigênese e o tempo de aparecimento do tumor (BOND et al., 2004). Existe uma inconsistência quanto ao papel do MDM2 SNP309 na susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer cervical. NUNOBIKI et al. (2011) encontraram uma prevalência de 78,8% para os genótipos TG+GG em amostras com HSIL quando

comparados com LSIL e os controles, entre as amostras positivas para HPV-HR e em especial aos genótipos HPV 16 e 18, mas não foi observada nenhuma associação entre as amostras e as frequências dos alelos T e G.

Em um estudo realizado no nordeste brasileiro (MEISSNER et al., 2007), também não foi possível associar de forma estatisticamente significativa a associação entre SNP309 e o risco e o diagnóstico precoce para CC, da mesma forma que não foi observada diferença para a frequência de alelos ou genótipos encontrados entre o grupo de pacientes com diagnóstico para CC em idade precoce (inferior a 40 anos) e o grupo de pacientes mais velhas. Em contrapartida, foi demonstrado a análise dos perfis de expressão de mRNA de 24 genes de checkpoint G1/S em 35 carcinomas do colo do útero, 26 HSIL, 33 LSIL e 28 amostras normais do colo de útero como controles foram avaliados por RT-PCR. MDM2 foi encontrado regulado positivamente em SIL, enquanto RBL1 foi encontrado regulado negativamente em todos os três grupos de casos, sugerindo que MDM2 seja um candidato em potencial para o desenvolvimento de neoplasmas cervicais (ARVANITIS e SPANDIDOS, 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a prevalência do vírus do papiloma humano (HPV) e seus diferentes genótipos, a ocorrência do polimorfismo dos genes *TP53* do códon 72 e *MDM2*, e fatores de riscos associados em mulheres com ou sem alteração no citopatológico, atendidas Ambulatório de Ginecologia e Serviço de Atendimento Especializado (SAE) da Faculdade de Medicina - UFPel, na cidade de Pelotas.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a prevalência da infecção pelo HPV em mulheres com ou sem alteração cervical;
- Investigar os genótipos de HPV presentes nestes grupos;
- Determinar a prevalência de polimorfismo da p53 no códon 72;
- Verificar se a ocorrência do polimorfismo da p53 do códon 72 em HPV infectadas confere maior risco para o desenvolvimento de lesões precursoras e câncer cervical;
- Encontrar possíveis associações entre a presença e o genótipo do HPV, o genótipo do polimorfismo da p53 do códon 72 e outros fatores sociodemográficos ao aumento de risco para lesões precursoras e câncer cervical, nos grupos analisados.
- Investigar a prevalência e a possível relação do polimorfismo do promotor do gene *MDM2* (SNP 309) na carcinogênese cervical
- Estabelecer um banco de DNA para testar futuramente associações entre outros polimorfismos e a história natural do HPV em mulheres HIV negativas e positivas.

4 ARTIGO 1

Comparação entre dois métodos de identificação molecular para Papilomavírus Humano

Ludmila Entiauspe, Emily Nunes, Tiago Collares, Mariângela Freitas da Silveira,
Fabiana Seixas

Manuscrito formatado nas normas do periódico Jornal Brasileiro de Doenças
Sexualmente Transmissíveis

Comparação entre dois métodos de identificação molecular para Papilomavírus Humano

Comparison between two methods for molecular characterization of Human

Papillomavirus

Ludmila Entiauspe^{1,5}, Emily Nunes^{2,5}, Tiago Collares^{3,5}, Mariângela Freitas da Silveira⁴,

Fabiana Seixas^{3,5/*}

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

²Discente de Graduação do Curso de Biotecnologia, CDTec, UFPel

³Docente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, CDTec, UFPel (Laboratório de Biologia Molecular).

⁴Docente do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, Centro de Pesquisas Epidemiológicas, UFPel.

⁵Grupo de Pesquisas em Oncologia Celular e Molecular, CDTec, UFPel.

Órgão financiador: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

*Endereço para correspondência: Fabiana K. Seixas, Laboratório de Genômica Funcional, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Campus Universitário Capão do Leão s/n, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil. Fax 55-53- 32757350 – E-mail: seixas.fk@gmail.com

Resumo

Introdução: Um método sensível para a detecção do Papilomavírus Humano (HPV) é importante para o tratamento precoce de lesões precursoras do câncer cervical.

Objetivos: Conhecer o espectro da infecção por HPV e verificar o melhor método para detecção molecular do vírus através dos métodos de reação em cadeia da polimerase (PCR) e *nested*-PCR (nPCR) em um grupo de 251 mulheres da cidade de Pelotas-RS.

Métodos: Das amostras coletadas extraiu-se o DNA genômico e submeteu-se à PCR com os primers MY09/11 e nPCR, empregando-se os pares de primers MY09/11 e, na segunda etapa, o par GP5+/6+. Os resultados obtidos foram aplicados ao software Excel[®] e analisados no software SPSS v.16[®]. **Resultados:** Observou-se que a prevalência de infecção por HPV de 6,8 % com a utilização dos primers MY09/11. Quando associado aos primers GP5/6, este resultado aumentou para 29,9% ($p < 0.001$).

Conclusão: O aumento encontrado na detecção de DNA HPV de 6,8 para 29,9% sugere que a técnica de nPCR MY09/11 seguido por GP5/6 é o método mais sensível em estudos de detecção de DNA-HPV a partir de amostras cervicais.

Palavras-chave: HPV, diagnóstico molecular, nested PCR

Abstract

Introduction: a sensitive method of detection for Human Papillomavirus (HPV) is important to facilitate the early treatment of precursors lesions of cervical cancer.

Objectives: To analyze the spectrum of HPV infection and compare the sensibility of DNA HPV detection using polymerase chain reaction (PCR) and nested PCR (nPCR)

methods in a group of 251 women of Pelotas-RS. **Methods:** The collected samples had genomic DNA extracted and was subjected to PCR methods with the primers MY09/11

and nPCR with the pair of primers MY09/MY11 and GP5+/6+. The results were applied to the softwares Epi-Info v.3.5.1[®] and STATA v.11[®] for analyzes. **Results:** It

was observed prevalence of HPV infection of 6.8% with the use of primers MY09/11.

When associated with primers GP5/6, this result increased to 29.9% ($p < 0.001$).

Conclusion: The increase founded in HPV DNA detection from 6.8 to 29.9% suggests that the technique of nPCR MY09/11 followed by GP5/6 is the most sensitive method to detect HPV DNA from cervical specimens.

Keywords: HPV, molecular diagnostics, nested PCR

Comparação entre dois métodos de identificação molecular para Papilomavírus Humano

Comparison between two methods for molecular characterization of Human

Papillomavirus

INTRODUÇÃO

Estimativas mostram que aproximadamente 291 milhões de mulheres no mundo estão infectadas pelo vírus do papiloma humano (HPV)⁽¹⁾. De acordo com o Ministério da Saúde, o Brasil é um dos líderes mundiais em incidência deste vírus, onde a cada ano são registrados 137 mil novos casos da infecção⁽²⁾. Com o uso de técnicas cada vez mais aprimoradas para a detecção do DNA do HPV, tornou-se possível confirmar a relação entre este vírus e o câncer cervical (CC), mostrando a importância da infecção por HPV no desenvolvimento de displasias e transformação de células cervicais em cancerosas^(3,4). Por sua vez, o CC é responsável por levar ao óbito todos os anos 31.400 mulheres na América Latina e 11.000 somente no Brasil^(5,6). Mesmo que a infecção pelo HPV possa ser detectada pela citologia genital triplíce (exame preventivo do câncer do colo uterino) ou pelo anatomopatológico (mediante biópsia cervical colposcopicamente dirigida), isto frequentemente não é possível. No entanto, a presença do HPV pode ser confirmada com alta precisão através da identificação do genoma viral presente nas lesões cervicais⁽⁷⁾.

Atualmente, várias são as técnicas para o diagnóstico molecular de HPV, que variam desde uma PCR convencional a métodos mais complexos, como a PCR em tempo real, captura híbrida (HC) e microarray^(8,9). Porém, a técnica de PCR ainda é considerada “padrão ouro” no diagnóstico de HPV, pois o DNA-alvo é seletivamente amplificado, que é uma sequência conhecida do DNA a ser investigado. No entanto essa

característica torna o método susceptível à contaminação por material nucléico exógeno ou amplificado de outra amostra⁽¹⁰⁾. Uma variação desta técnica, denominada por nested-PCR (nPCR) com os conjuntos de primers MY09/11 e GP5⁺/6⁺, mostra-se ser um método de alta sensibilidade e especificidade para diagnóstico do DNA-HPV⁽¹¹⁾, onde ambos amplificam uma sequência pertencente a região conservada L1 do genoma viral, estando presente em todos os genótipos do HPV e possibilitando assim uma detecção do DNA-HPV em amplo espectro⁽¹²⁾.

O par MY09/11 é sintetizado a partir de vários nucleotídeos degenerados em cada primer, capazes de identificar um amplo espectro de tipos de HPV e flanqueia uma sequência de cerca de 450 pb⁽¹³⁾. O par GP5⁺/6⁺ consiste de uma sequência fixa de nucleotídeos para cada primer. Esse par usa baixa temperatura de anelamento durante o PCR, o que permite que se anele com a fita molde, mesmo que não haja total complementaridade, possibilitando a detecção de um amplo espectro de tipos de HPV, até mesmo daqueles que possuam leves alterações em suas sequências na região conservada L1, e amplifica uma sequência de cerca de 140 pb, interna à sequência flanqueada pelo par MY⁽¹²⁾. Com base no fato de que a infecção pelo HPV é um fator precursor para a evolução do CC, a detecção do genoma viral pode ser utilizada como estratégia de vigilância precoce para identificar mulheres infectadas por genótipos de HPV de alto-risco, suscetíveis a infecção e progressão das lesões cervicais⁽⁷⁾, pois trata-se de uma doença de alta mortalidade a qual pode ser prevenida. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo conhecer o espectro da infecção e analisar qual o melhor método molecular para identificar o DNA do HPV em um grupo de 251 mulheres da cidade de Pelotas-RS, através do método de PCR e *nested*-PCR.

MÉTODOS

Amostra:

Trata-se de um estudo experimental do tipo transversal, realizado entre julho e outubro de 2010. Um total de 251 mulheres foi selecionado de forma sequencial para participar do estudo, as quais assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Estas foram encaminhadas à consulta ginecológica, onde foram coletadas amostras de secreção cérvico-vaginal da região do endocérvice para a análise molecular, sendo as amostras acondicionadas e encaminhadas ao Laboratório de Genômica Funcional do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas (CDTec-UFPel), onde foram estocadas a temperatura ambiente até o momento da extração do material genômico. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa na Área da Saúde (CEPAS) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) em junho de 2009. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos contidos na Declaração de Helsink.

Cálculo da amostra, desfecho e análise estatística:

Para calcular o tamanho da amostra para o estudo de prevalência, utilizou-se o programa Epi-Info versão 6.0, tendo como parâmetros nível de confiança de 95%, poder de 80% e erro de 5%, como fator de exposição à presença do vírus HPV. Com estes parâmetros, encontrou-se uma amostra de 246 sujeitos. Ao final do estudo foram coletadas 251 amostras. O desfecho medido foi a presença de HPV identificado mediante a técnica de PCR.

Os dados coletados foram organizados em uma planilha eletrônica no software EXCEL[®] e posteriormente transferidos ao software SPSS versão 16.0[®]. Foi realizado o

cálculo de prevalência de HPV, utilizando-se o teste do Qui-quadrado (χ^2). Foram mantidas no modelo aquelas variáveis que alcançaram um $p \leq 0,05$.

Coleta e Extração do Material Genômico:

As amostras coletadas foram acondicionadas em tubos *ependorf* de 1,5 mL contendo 300 μ L de Solução de lise celular (Kit PuregeneTM Gentra Systems - Qiagen), e encaminhadas em um recipiente apropriado ao laboratório de Genômica Funcional (CDTec - UFPel), para a análise molecular. Após a retirada das escovas, os tubos foram submetidos à digestão com 1,5 μ L de Proteinase K (10mg/ml) e incubação por 16 horas em temperatura ambiente. O material genômico extraído (DNA) foi purificado utilizando o protocolo de extração do Kit PuregeneTM (Gentra Systems), conforme especificações do fabricante. Como controle da reação para testar a adequabilidade do DNA extraído foi realizada a PCR para o gene humano *TP53*, utilizando os primers descritos previamente por Lin *et al.*⁽¹⁴⁾.

Detecção do HPV pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):

Utilizou-se o par de primers externos MY09/11 (Tabela 1), descritos previamente por Manos *et al.*⁽¹⁵⁾. As condições da reação para o foram constituídas por 40 ciclos subsequentes de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 55°C por 30 segundos para o anelamento, 72°C por 30 segundos extensão, com desnaturação inicial de 95°C por 9 minutos e extensão final de 72°C por 5 minutos^(16,17). Como controle positivo para infecção por HPV empregou-se uma amostra de linhagem de células HeLa, e o controle negativo foi composto por mistura de amplificação e sem presença de DNA. Os amplicons obtidos foram visualizados em gel de agarose corado com GelRedTM (Biotium Inc., CA) com concentração de 1,0%, em transiluminador ultra-violeta (UV)⁽¹⁸⁾.

Detecção do HPV pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase nested (nPCR):

A detecção do HPV realizada pela técnica de *nested* PCR foi efetuada em duas etapas, onde na primeira se utilizou o par de primers MY09/11, cuja metodologia foi descrita anteriormente. A partir de uma alíquota de 1µL do produto obtido nesta etapa, realizou-se a segunda etapa com o par de primers internos GP5/6 (Tabela 1), os quais amplificam um fragmento de 140pb⁽¹⁹⁾. A condição de termociclagem foi semelhante à primeira etapa. Os produtos da nPCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% sob as mesmas condições da técnica de PCR e realizada a documentação fotográfica.

RESULTADOS

Das 251 amostras analisadas, todas amplificaram para o gene *TP53*, conferindo adequabilidade do DNA para detecção do HPV por PCR e nPCR. A análise do DNA-HPV por PCR MY09/11 foi observada em 17 amostras, enquanto que a nPCR apresentou presença do DNA viral em 75 amostras, correspondendo a 6,8% e 29,9%, respectivamente. A técnica de nPCR, além de amplificar as 17 amostras amplificadas pela PCR MY09/11, encontrou positividade em mais 58 (24,8%), como pode ser observado na Tabela 2, aumentando em até 4 vezes a detecção do DNA viral ($p < 0.001$). O teste de confiança mostrou 100% de sensibilidade na técnica de PCR convencional, e uma especificidade de 75,2%, quando comparado a nPCR (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Muitos são os estudos comparando diferentes métodos biomoleculares para a detecção do DNA-HPV. Husnjak et al.⁽¹⁷⁾ em um estudo a partir de amostras cervicais utilizando PCR convencional com os primers MY09/11 e comparando com nPCR, observaram um aumento de 38,8% na taxa de positividade para o DNA do HPV neste último método,

mostrando que este apresenta maior eficácia em detectar HPV a partir de material com baixas cópias do vírus. Evander et al.⁽²⁰⁾ reportaram uma detecção de 5,9% de DNA-HPV através do emprego dos primers MY09/11. Tal detecção aumentou para 20,3% quando empregou a nPCR com os primers MY09/11 seguidos de GP5/6, sugerindo que os primers GP5/6 favoreceriam a uma maior eficácia de amplificação por não apresentarem bases denegeneradas e por amplificarem uma sequência menor (140pb) e interna aos primers MY09/11 (450pb). Porém, em um estudo semelhante, os autores não encontraram diferença significativa na comparação entre os dois pares de primers: a detecção HPV-DNA com o emprego dos primers MY09/11 mostrou-se em 45,2%, e 42,8% para os primers GP5+/6+¹²(Qu et al, 1997).

De acordo com Demathe et al.⁽²¹⁾, as variações das taxas de detecção de DNA-HPV encontradas na literatura sugerem uma diferença potencial na habilidade para amplificar fragmentos de diferentes tamanhos e tipos específicos de HPV de acordo com os métodos de detecção de DNA utilizados e também podem ser resultado dos tipos de material estudados (esfregaços, material congelado, material parafinado, embebido em formalina), da localização anatômica, de questões populacionais e desenho dos primers. Estes autores realizaram estudo a partir de amostras de carcinoma epidermóide de lábio, e foi observado que o emprego da nPCR aumentou em até 6 vezes a taxa de detecção do DNA-HPV, quando comparado a PCR MY09/11.

No presente estudo, foi comparada a taxa de detecção de DNA-HPV através do emprego da PCR com os primers MY09/11 e nPCR, realizada a partir dos primers MY09/11 e seguida por GP5/6. Os resultados observados estão de acordo com os estudos citados acima, e sugerem que a técnica de nPCR é a mais adequada para detectar a presença de DNA-HPV. Além disso, ressaltam a importância dos métodos de

diagnóstico molecular como uma ferramenta complementar aos exames preventivos convencionais, além de possibilitar um rastreamento precoce das lesões subclínicas, precursoras do câncer cervical, favorecendo ao acompanhamento mais aproximado da paciente.

CONCLUSÃO

O aumento encontrado na detecção de DNA HPV de 6,8 para 29,9% sugere que a técnica de nPCR MY09/11 seguido por GP5/6 é o método mais sensível em estudos de detecção de DNA-HPV a partir de amostras cervicais.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro investido neste estudo.

Conflito de interesses: Não existe conflito de interesses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. De Sanjosé S, Almirall R, Lloveras B, Font R, Diaz M, Muñoz N, et al. Cervical Human Papillomavirus Infection in the Female Population in Barcelona, Spain. *Sex Transm Dis* 2003; 30(10):788-793.
2. Ministério da Saúde do Brasil. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. 2009. p. 94.

3. Cox JT. The development of cervical câncer and its precursors: what is the role of human papillomavirus infection? *Cur Opin Obstet Gynecol* 2006; 18(supp 1): S5 - S13.
4. Muñoz N, Castellsagué X, De González AB, Gissman L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 2006; 24(S3):S3/1-S3/10.
5. World Health Organization. Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Summary report on HPV and cervical cancer statistics in Brazil. 2007, P.28. Disponível em www.who.int/hpvcentre. Acesso em 09 Ago 2012.
6. Ministério da Saúde do Brasil. Portal da Saúde, SUS. Papilomavírus Humano. 2010. Disponível em <http://portal.saude.gov.br>. Acesso em 09 Ago 2012.
7. Fernandes APM, Gonçalves MAG, Simões RT, Quintana SM, Duarte G, Donadi EA. Influência da infecção pelo HIV-1 sobre a presença do HPV em lesões do colo uterino. *J Bras Doenças Sex Transm* 2004; 16(1):21-25.
8. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2000; 38(1): 357-361.
9. Choi YD, Jungc WW, Nama JH, Choi HS, Park CS. Detection of HPV genotypes in cervical lesions by the HPV DNA Chip and sequencing. *Gynecol Oncol* 2005;98: 369-375.
10. Trofatter KF. Diagnosis of human papillomavirus genital tract infection. *Am J Med* 1997; 102(5A):21-27.

11. Souza NST de, Melo VH de, Castro LFP de. Diagnóstico da infecção pelo HPV em lesões do colo do útero em mulheres HIV+: acuidade da histopatologia. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2001; 3(6):355-361.
12. Qu W, JianG G, Cruz Y, Chang CJ, Ho GYF, Klein RS, et al. QU, W. et al. PCR Detection of Human Papillomavirus: Comparison between MY09/MY11 and GP51/GP61 Primer Systems. *J Clin Microbiol* 1997; 35(6): 1304-10.
13. Van Doorn LJ, Kleter B, Quint WGV. Molecular detection and genotyping of human papillomavirus. *Expert Rev Mol Diagn.* 2001; 4:394-402.
14. Lin YC, Huang HI, Wang LH, Tsai CC, Lung O, Dai CY, et al. Polymorphisms of COX-2-765 G>C and p53 codon 72 and risks of oral squamous cell carcinoma in a Taiwan population. *Oral Oncol* 2008 ;44:798-804.
15. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AI, Broker TR, Wolinsky SM. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989; 7:209–214.
16. Gravitt PE, Burk RD, Lorincz A, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME, et al. A Comparison between Real-Time Polymerase Chain Reaction and Hybrid Capture 2 for Human Papillomavirus DNA Quantitation. *Cancer Epidemiol Biom Prev* 2003; 12: 477-484.
17. Husnjak K, Grce M, Magdic L, Pavelic K. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papilomavírus in cervical cell specimens. *J Virol Meth* 2000; 88:125-134.
18. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol* 2005; 32S:S43–S51.

19. Snijders PJF, Van Den Brule AJC, Schrijnemakers HFJ, Snow G, Meijer CJLM, Walboomers JMM. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol* 1990; 71:173-181.
20. Evander M, Edlund K, Boden E, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, et al. Comparison of a One-Step and a Two-Step Polymerase Chain Reaction with Degenerate General Primers in a Population-Based Study of Human Papillomavirus Infection in Young Swedish Women. *J Clin Microbiol* 1992; 987-992.
21. Demathe A, Bernabé DG, Garcia JF, Nunes CM, Miyahar GI. Comparação entre dois métodos de detecção de DNA de papilomavírus humano em carcinoma epidermoide de lábio. *J Bras Patol Med Lab* 2010; 46(2):85-90.

Tabela 1 . Sequências dos primers gerais para a detecção do DNA-HPV

Primer	Seqüência* (5'-3')	Tamanho (bp)
MY11	GCMCAGGGWCATAAYAATGG	~450 ⁷
MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC	
GP5	TTTGTTACTGTGGTAGATAC	~140 ¹⁹
GP6	GAAAAATAAACTGTAAATCA	
* M = A+C, R = A+G, W = A+T, Y = C+T		

Tabela 2. Comparação entre os métodos de PCR MY09/11 e nPCR MY09/11 e GP5/6

nPCR MY09/11 e GP5/6			
PCR MY09/11	Negativo (%)	Positivo (%)	Total (%)
Negativo	176 (75,21)	58 (24,8)	234 (100,00)
Positivo	0 (0,00)	17 (100,00)	17 (100,00)
Total	176 (70,12)	75 (29,9)	251 (100,00)
Pearson $\chi^2(1) = 42.7916$ Pr = <0.001			

Tabela 3. Sensibilidade e especificidade da técnica de PCR convencional utilizando os primers MY09/11 com relação à nPCR.

PCR MY09/11	nPCR Negativo	nPCR Positivo
Positivo	0%	100,0%
Negativo	75,2%	24,8%
Total	176	75
Qui-quadrado; $p < 0,001$		

High prevalence of oncogenic HPV genotypes found in women from Brazil

Ludmila G Entiauspe; Mariângela Silveira; Emily M Nunes; Suélen P
Basgalupp; Dulce Stauffert; Odir A. Dellagostin; Tiago Collares; Fabiana K.
Seixas

Manuscrito formatado nas normas do periódico *Brazilian Journal of
Microbiology*

High prevalence of oncogenic HPV genotypes found in women from Brazil

Ludmila G Entiauspe^{1,2}; Mariângela Silveira³; Emily M Nunes¹, Suélen P Basgalupp¹; Dulce Stauffert⁴, Odir A. Dellagostin^{1,2}; Tiago Collares^{1,2}; Fabiana K. Seixas^{1,2,5}

¹ Functional Genomics Laboratory, Technology Development Centre (CDTec), Federal University of Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, 96010-900, Brazil:

² Post-Graduate Programme in Biotechnology, CD Tec, UFPel, Pelotas, RS, 96010-900, Brazil.

³ Post-Graduate Programme in Epidemiology, UFPel, Pelotas, RS, 96020-220 Brazil.

⁴ School of Medicine Laboratory, UFPel, Pelotas, RS, 96020-220, Brazil.

⁵Corresponding author: Fabiana Kömmling Seixas, Laboratório de Genômica Funcional, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, 96010-900, Pelotas city, RS, Brazil. Tel: +55 53 32757583. Fax: +55 53 32757551. E-mail address: seixas.fk@gmail.com

Abstract

Oncogenic human papillomavirus (HPV) genotypes are strongly associated with premalignant and malignant cervical lesion. The purpose was to determine HPV prevalence and genotypes, and to estimate cervical cancer risk factor associations. Cervical samples were obtained from 251 women seeking gynecological care at the Pelotas School of Medicine Clinic. This is a cross-sectional study. HPV-DNA was amplified by nested-PCR using MY09/11 and GP5/6 primers, and the sequencing was used for genotyping. Sociodemographic and behavioral risk factors were obtained by closed questionnaire, and its relationship to HPV infection prevalence were analyzed. Statistical analyses were performed using SPSS 16.0 software, and differences were considered significant at $p < 0.05$. As results, the prevalence of HPV infection was 29.9%. The most frequent genotype was HPV-16 (41.3%), followed by HPV-18 (17.3%), and HPV-33 (9.3%). Others nine HPV genotypes were also found. On this population, prevalence of oncogenic HPV genotypes was high, but does not seem to confer relationship with the risk factors investigated. Futures investigations in larger populations are necessary, for the proposition of more appropriated monitoring strategies and treatment according to the Brazilian health service reality, as well as patients.

Keywords: HPV - SDT - molecular epidemiology - cervical cancer

1. Introduction

The human papillomavirus (HPV) is one of the most common etiologic agent of sexually transmitted diseases, with high prevalence rates. Actually, more than 100 HPV types have been described, of which 40 can infect the mucosa of the anogenital tract in both, men and women. According to their oncogenic potential, those viruses are classified as high- or low-risk genotypes (3). The high-risk oncogenic genotypes are those that are strongly associated with premalignant and malignant cervical lesions, mainly HPVs 16 and 18, being also responsible for 70% of invasive cervical cancer (CC) cases in Brazil (16).

In Brazil, cervical cancer is the third most common type of cancer in the female population, and the fourth major cause of death in women. For 2012, 17.540 new cases were expected, 17 cases per 100,000 women (15). Highly accurate techniques and epidemiologic studies demonstrate the relationship between the development of cervical cancer and HPV. HPV-DNA has been detected in 99.7% of cervical cancer cases worldwide (5).

Although HPV infection is considered an integral part of cervical cancer development, an association between HPV infection, oncogenic genotypes persistence, and other risk factors, determine the development of cervical intraepithelial neoplasia (CIN), and cervical cancer (26). The risk factors include youth, a high number of sexual partners throughout life, early sexual activity, tobacco smoking, low socioeconomic status, and genetic factors (8, 11, 13). In addition, infections caused by human immunodeficiency virus (HIV), bacterial vaginosis (BV), *Trichomonas vaginalis* (TV), and by *Chlamydia trachomatis* (CT) were involved as co-factors for cervical cancer development, adjuvants of the neoplastic process (9,17).

Based on these data, our study aimed to detect the prevalence of HPV infection, to identify HPV genotypes, and to analyze cervical cancer risk factors in a female population representative of Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

2. Subjects, Materials and Methods

2.1 Study Population

This is a cross-sectional study. From May 2010 to May 2011, 251 women seeking gynecologic care at the gynecological ambulatory clinic at the Pelotas Federal University School of Medicine (UFPel) fulfilling eligibility criteria (not pregnant, sexually active, and not menstruating), and agreeing to participate in the study, were sequentially selected. The study used a closed questionnaire adapted from a previous study (22). Routine gynecological exams (cervicitis indicators, visual inspection with acetic acid and Lugol's iodine), were realized, and included in the questionnaire, as well the patient's recorded information (last Pap test result).

The study was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine – Federal University of Pelotas in June 2009, and informed consent was obtained from all participants. All procedures were carried out in accordance with the guidelines of the Helsinki Declaration.

2.2 Sample collection and processing

Two cervical samples were collected from each patient. The first, with an Ayre's spatula was placed on slides for Bacterial vaginosis (BV) and *Trichomonas vaginalis* (TV) analysis by the Gram method. The second sample was collected with a cytobrush,

and placed into 1.5 ml eppendorf tubes containing 300 μ L of Cell Lysis Solution (PuregeneTM DNA Extraction Kit, *Gentra Systems* Minneapolis, MN). The tubes were submitted to digestion using 1.5 μ L of Proteinase K (10mg/ml, New England Biolabs, MA), and incubated overnight at room temperature. The genomic material (DNA) was extracted, according to manufacturer specifications. As control for extracted DNA quality, the human *TP53* gene PCR was performed, using the primers previously described (10). PCR were performed in a final reaction volume of 12 μ L, and was carried out with one cycle 94°C for 3 min, followed by 40 cycles at 94°C for 30 sec, 57°C for 30, 72°C for 30 sec and a final extension for 3 min at 72°C (24).

HPV detection was carried out using nested-PCR (nPCR) technique, which is performed in two rounds: the first using MY09/11 primers (12) and amplifying a 450 pb fragment, the second used GP5/6 internal primers (23), which amplify the 140 pb fragment. The MY90/11 PCR reaction was performed in a final volume of 25 μ L, and the conditions were as follows: 40 cycles of denaturation (1 min at 95°C), annealing (1 min at 55°C), and extension (1 min at 72°C) (6). In the second round, the conditions were 40 cycles of denaturation (30 sec at 94°C), annealing (30 sec at 45°C), and extension (30 sec at 72°C) (7). Both PCR reactions were preheated for 9 min at 95°C, and a final extension for 5 min at 72°C. All PCR products were visualized on a 2.0% agarose gel with GelRedTM (Biotium Inc., CA).

2.3 HPV sequencing

HPV positive PCR products were purified previously using the Gel Band purification kit (GE Healthcare, USA) according the manufacturer instructions. The sequencing was performed in a MegaBACE 1000 DNA sequencer (GE Healthcare,

USA), using Dynamic ET-terminator technology. Chromatograms were assembled and analyzed using the ContigExpress[®] module of the Vector NTI 10.0 suite (Invitrogen, USA). The assembled sequences were submitted to BLAST alignment (www.ncbi.nlm.gov/BLAST), against sequences available in GenBank.

2.4 Statistical analyses

Chi-square (χ^2) test was used to evaluate the association between HPV presence (and their HR/LR genotypes) with the variables of questionnaire. A multivariate analysis was made using logistic regression applied to a hierarchical model. The analysis was performed using SPSS 16.0 software (SPSS, Chicago, IL). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

Four hundred women were approached to participate, but only 251 were considered eligible for the study. The mean age was 33.3 years old (median 34 years old), ranging from 18 to 45 years old. Most of the samples did not present endocervical mucopurulent discharge (77.2%), friability (70.8%), or cervical motion tenderness (84.6%). The visual inspection with acetic acid (VIA) and visual inspection with Lugol's iodine (VILI) were negative for sub-clinical lesions in 85.9% and 71.1% of the participants, respectively. The Gram test detected BV in 9.2% of the women, and TV in 2.8%. Of the Pap smear results, 54.2% were normal, 38.6% inflammatory, 0.8% with ASCUS, 0.4% showed presence HPV, 2.1% indicated NIC I, and 0.4% indicated NIC II. Colposcopies were abnormal in 5% of the participants (data not show). The behavioral and sociodemographic characteristics are showed on Table 1. HPV was detected in 29.9%

(N=75), HR-HPV in 25.3%, and LR-HPV in 2.9% of the samples (Table 2). The most frequent genotype was HPV-16 (41.3%), followed by HPV-18 (17.3%), and HPV-33 (9.3%). The genotypes HPV-6 (2.7%), -31 (2.7%), -43 (1.3%), -45 (1.3%), -54 (4.0%), -56 (4.0%), -58 (4.0%), -70 (1.3) and -81 (2.7%) were also found. Six samples (8.0%) could not be classified by sequencing due to overlap of the sequence-peaks. These were categorized as HPV-X (Fig. 1).

The bivariate analyses didn't show statistical significance in relation to behavioral characteristics, although it was observed that HPV infection occurred mostly in women who were ex-smokers (35.5%), had consumed alcohol at least once a week (34.9%), had never been pregnant (45.7%), began sexual activities between 13-15 years of age (35.4%), had from 2 to 4 sexual partners in life (26.9%), had STD detected in the last 12 months (35.3%), and whose last Pap test was in less than 3 years (32.3%). Cervicitis indicators showed that 30.1% of the samples did not present endocervical mucopurulent discharge, or friability at (31.6%); cervical motion tenderness was observed in 31.6% of the women (Table 3). The VIA inspection was positive in 34.3% of the participants, and VILI inspection in 29.6%. The presence of BV and TV was observed for 31.8% and 28.6% of the patients respectively. The cytological results for HPV presence, and NIC II was confirmed by nPCR for all ($P=0.362$). The colposcopy results were abnormal in 41.7% of the HPV positive cases ($P=0.379$). In relation to high or low risk HPV infection, and variables, it was observed that all high risk HPV infections showed a direct association (100%) with NIC I and NIC II Pap test results ($P=0.470$). No statistical difference was also found in the multivariate analyses (data not show).

4. Discussion

Brazil has a population of 69.14 million women who are at risk for cervical cancer development, and current estimates indicate that 14.1% of the women in the general population have harbored a cervical HPV infection at some time in their lives. A total 70.7% of invasive cervical cancers are attributed to HPV-16 or -18 (27). HPV infection prevalence in Brazil varies between 7% and 43%, according to a systematic review of the literature performed in four Brazilian regions (1). In this study, the prevalence was within the expected range (29.9%). Two other studies were realized in the same state in Southern Brazil: on the first was found a higher HPV infection prevalence (60%) in HIV negative women, (with or without cervical lesions) than reported here (4). In the second study Rosa et al (20) found that HPV infection was lower (12.3%). In the Northern regions, Noronha et al. (18) conducted a screening study in 1021 women in the city of Belém, and observed an HPV prevalence of 12.4%.

In this study, the most prevalent genotype was HPV-16, followed by HPV-18. These findings are consistent with Oliveira-Silva et al (19), which in a study performed in Rio de Janeiro (with PCR for DNA-HPV detection in 297 HPV positive women), noted a prevalence of 28% for HPV-16, and 14.4% for HPV-18, differing by only a third from the most prevalent genotype, which was reported for HPV-45 (7.6%), and in our study was observed for HPV-33 (9.3%). However, Mendonça et al (14) carried out a study with 248 women in the city of Recife, and also observed that the HPV-33 genotype was the third most prevalent (13.9%), a similar percentage to the present study. The high prevalence of oncogenic genotypes found in this study indicates the need for frequent monitoring, and suggests nPCR technique for DNA-HPV detection as an alternative to early identification of women at high risk for cervical cancer development. Previous studies have already demonstrated that the use of primers pair

MY09/11 and GP5/GP6 in a nPCR assay increases the sensitivity of HPV detection compared with PCR assay (2, 21)

Recent data (25) show that there has occurred a large decrease in the number of smokers in Brazilian population, going from 16.2% in year of 2006 to less than 15% in 2011. These data show that the state capital of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, has the largest number of smokers (23%), higher than the one found in this study. The survey research also identifies that there was an increase in Pap tests realized in the last three years (89.6%) in women who had more than 12 years schooling. This study also observed a higher percentage of Pap tests realized during the same period (< 3 years), but didn't found a relation with higher schooling. Some studies correlate potential risk factors with HPV infection. In this study, it wasn't possible to observe this relationship. It's believed that an increasing awareness of condom use and smoking health harms may be contributed to these findings.

Since the study is clinical based, the results should be considered as preliminary, giving an indication of the high prevalence of HPV infection by oncogenic genotypes found in women from Pelotas, but not being capable of correlating the infection with behavioral and socio-demographic factors. Further population based studies from the same geographical area are needed. The current research helps to identify regional differences of HPV genotypes, given the large area and population differences exist in Brazil, and is a contribution to the medical care of the population of Pelotas and to research centers studying human papillomavirus.

Acknowledgements:

The authors are grateful to Brazilian National Research Council (CNPq).

Conflict of Interest:

None declared.

References

1. De Villiers E.M.; Fauquet C.; Broker T.R.; Bernard H.U.; zur Hausen H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, 17-27.
2. Muñoz, N.; Castellsague, X.; de Gonzalez, A.B.; Gissmann, L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 24 (Suppl 3), S3-1-S310.
3. Ministério da Saúde do Brasil Instituto Nacional do Câncer. (2011). Estimativas 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: *INCA*; p 35.
4. Fernandes, A.P.M.; Gonçalves, M.A.G.; Simões, R.T.; Quintana, S.M.; Duarte, G.; Donadi, E.A. (2004). Influência da infecção pelo HIV-1 sobre a presença do HPV em lesões do colo uterino. *J. Bras. Doenças Sex. Transm.* 16,21-25.
5. Wang, S.S.; Gonzalez, P.; Yu, K.; Porras, C.; Li, Q.; Safaeian, M.; Rodriguez, A.C.; Sherman, M.E.; Bratti, C.; Schiffman, M.; Wacholder, S.; Burk, S.D.; Herrero, R.; Chanock, S.J.; Hildesheim, A. (2010). Common Genetic Variants and Risk for HPV Persistence and Progression to Cervical Cancer. *PLOS ONE*. 5, e8667.
6. Kapeu, A.S.; Luostarinen, T.; Jellum, E.; Dillner, J.; Hakama, M.; Koskela, P.; Lenner, P.; Love, A.; Mahlamaki, E.; Thoresen, S.; Tryggvadottir, L.; Wadell, G.; Youngman, L.; Lehtinen, M. (2009). Is smoking an independent risk factor for invasive cervical cancer? A nested case-control study within Nordic biobanks. *Am. J. Epidemiol.* 169, 480-488.
7. Louie, K.S.; de Sanjosé, S.; Diaz, M.; Castellsague, X.; Herrero, R.; Meijer, C.J.; Shah, K.; Franceschi, S.; Muñoz, N.; Bosch, F.X. (2009). Early age at first sexual

intercourse and early pregnancy are risk factors for cervical cancer in developing countries. *Braz. J. Cancer*. 100, 1191-1197.

8. Marlow, L.A.; Waller J.; Wardle, J. (2007). Public awareness that HPV is a risk factor for cervical cancer. *Braz. J. Cancer*. 97; 691-694.
9. King, C.C.; Jamieson, D.J.; Wiener, J.; Cu-Uvin, S.; Klein, R.S.; Rompalo, A.M.; Shah, K.V.; Sobel, J.D. (2011). Bacterial vaginosis and the natural history of human papillomavirus. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol*. 2011: 319460.
10. Nam, K.H.; Kim, Y.T.; Kim, S.R.; Kim, S.W.; Kim, J.W.; Lee, M.K.; Nam, E.J.; Jung, Y.W. (2009). Association between bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. *J. Gynecol. Oncol*. 20, 39-43.
11. Silveira, M.F.; Santos, I.S. (2006). Impact of an educational intervention to promote condom use among the male partners of HIV positive women. *J. Eval. Clin. Pract*. 12; 102-111.
12. Lin, Y.C.; Huang, H.I.; Wang, L.H.; Tsai, C.C.; Lung, O.; Dai, C.Y.; Yu, M.L.; Ho, C.K.; Chen, C.H. (2008). Polymorphisms of COX-2 -765G>C and p53 codon 72 and risks of oral squamous cell carcinoma in a Taiwan population. *Oral Oncol*. 44, 798-804.
13. Thurow, H.S.; Haack, R.; Hartwig, F.P.; Oliveira, I.O.; Dellagostin, O.A.; Gigante, D.P.; Horta, B.L.; Collares, T.; Seixas, F.K. (2011). TP53 gene polymorphism: importance to cancer, ethnicity and birth weight in a Brazilian cohort. *J. Biosci*. 36, 823-831.
14. Manos, M.M.; Ting, Y.; Wright, D.K.; Lewis, A.I.; Broker, T.R.; Wolinsky, S.M. (1989). The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells*. 7, 209-214.

15. Snijders, P.J.; van den Brule, A.J.; Schrijnemakers, H.F.; Snow, G.; Meijer, C.J.; Walboomers, J.M. (1990). The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J. Gen. Virol.* 71(Pt 1), 173-181.
16. Gravitt, P.E.; Peyton, C.L.; Alessi, T.Q.; Wheeler, C.M.; Coutlee, F.; Hildesheim, A.; Schiffman, M.H.; Scott, D.R.; Apple, R.J. (2000). Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 38, 357-361.
17. Husnjak, K.; Grce, M.; Magdic, L.; Pavelic, K. (2000). Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J. Virol. Methods.* 88, 125-134.
18. WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer. (2010). Human Papillomavirus and Related Cancers in Brazil. *Summary Report 2010*. Available on <http://www.who.int/hpvcentre>. Accessed on 01 Mar 2013.
19. Ayres, A.R.G.; Silva, G.A. (2010). Cervical HPV infection in Brazil: systematic review. *Rev. Sau. Publ.* 44,963-974.
20. Entiauspe, L.G.; Teixeira, L.O.; Mendonza-Sassi, R.A.; Gonçalves, C.V.; Gonçalves, P.; Martinez, A.M.B. (2010). Human papillomavirus: prevalence and genotypes found among HIV-positive and negative women at a reference center in the far south of Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 43, 260-263.
21. Rosa, M.I.; Fachel, J.M.G.; Rosa, D.D.; Medeiros, L.R.M.; Igansi, C.N.; Bozzetti, M.C. (2008). Persistence and clearance of human papillomavirus infection: a prospective cohort study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 199(6), 617.e617.e7.

22. Noronha, V.L.; Cruz, E.M.; Pinho, C.N.; Mello, W.A.; Villa, L.L.; Russomano, F.B. (2011). Human Papillomavirus (HPV) in Women Screened to Cervical Uterine Cancer, Belém – Pará – Brazil. *J. Bras. Doenças Sex. Transm.* 23,5-11.
23. Oliveira-Silva, M.; Lordello, C.X.; Zardo, L.M.G.; Bonvicino, C.R.;, Moreira, M.A.M. (2011). Human Papillomavirus in Brazilian women with and without cervical lesions. *Virol. J.* 8, p.4.
24. Mendonça, V.G.; Guimarães, M.J.B.; Filho, J.L.L.; Mendonça, C.G.; Martins, D.B.G.; Crovella, S.; Alencar, L.C.A. (2010). Infecção cervical por papilomavírus humano: genotipagem viral e fatores de risco para lesão intraepitelial de alto grau e câncer de colo do útero. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 32, 476-485.
25. Coser, J.; Boeira, T.R.; Fonseca, A.S. K.; Ikuta, N.; Lunge, V.R. (2011). Human papillomavirus detection and typing using a nested-PCR-RFLP assay. *Braz. J. Infect. Dis.* 15, 467-472.
26. Seaman, W.T.; Andrews, E.; Couch, M.; Kojic, E.M.; Cu-Uvin, S.; Palefsky, J.; Deal, A.M.; Webster-Cyriaque, J. (2011). Detection and quantification of HPV in genital and oral tissueas and fluids by real time PCR.
27. Vigitel - Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico, Ministério da Saúde do Brasil (2011). Sistema de Monitoramento de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas Não Transmissíveis por meio de Inquérito Telefônico. Available on <http://portal.saude.gov.br> Accessed 01 Mar 2013.

Table 1. Distribution of socioeconomic, demographic and behavioral characteristics

Variable	(%)
Age (years)	
18 - 24	17,5
25 - 30	21,9
31 - 35	17,9
36 - 39	19,9
40 - 45	22,7
Skin color	
White	65,7
Black	12,4
Others	21,9
Reading ability	
Yes	98,0
No	2,0
Schooling (years)	
0	2,0
1-4	12,9
5-8	37,5
9-11	14,9
≥12	32,7
Marital status	
Married/consensual union	81,3
Single	11,2
Separated/divorced/widowed	7,6
Live alone	
Yes	2,8
No	97,2
Family Income (minimum wages)	
0 - 1	25,5
2	41,3
3	23,5
≥ 4	9,7
Cigarette smoking	
Current smoker	19,9
Ex-smoker	24,7
Never smoker	55,4
Alcohol consume (last 4 weeks)	
At least once a week	17,1
Less than once a week	29,5
Never	53,4
Pregnancy	
Yes	81,7
No	18,3
Use of condom (in life)	
Yes	90,0
No	10,0

Sexual activity began (years)	
≤ 12	2,8
13 – 15	33,1
16 – 18	49,8
≥ 19	14,3
Sexual partners (in life)	
1	30,8
2 – 4	44,4
5 – 8	15,2
≥ 9	9,6
STD detection (last 12 months)	
Yes	6,8
No	93,2
Last Pap test	
Never	4,4
< 3 years	74,9
> 3 years	15,1
Don't remember	5,6

Table 2. HPV detection and oncogenic potential

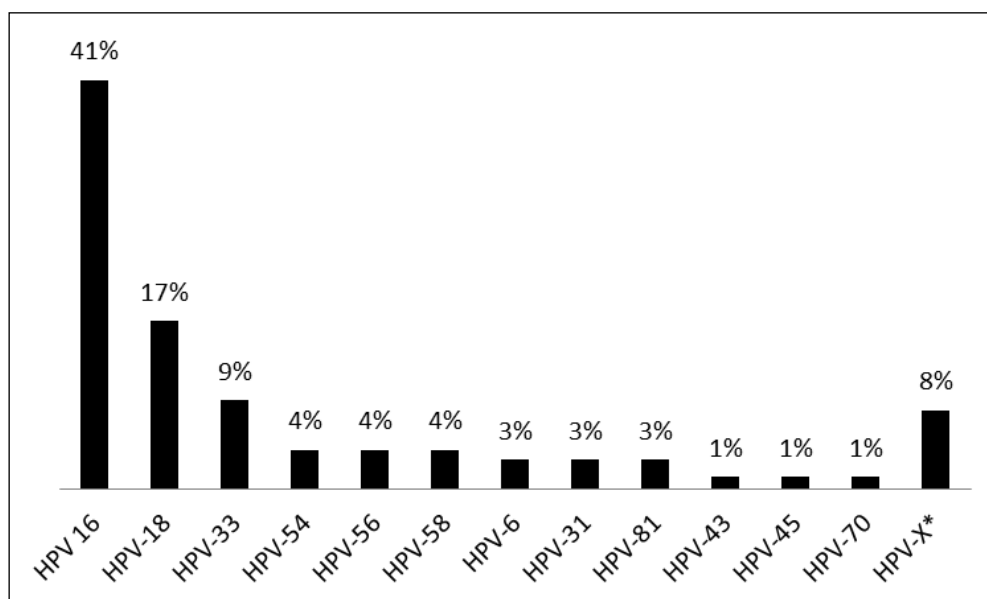
Variables	Number	(%)
HPV	251	
Positive		29,9
Negative		70,1
HPV oncogenic potential	69*	
High risk		89,9
Low risk		10,1

*HPV positives by nPCR

Table 3. Frequency distribution of HPV infection according Cervicitis indicators, visual inspection, bacterial infection and Pap test results.

Variables	HPV infection	
	Positive (%)	Negative (%)
Endocervical mucupurulent discharge		
Yes	28,1	71,9
No	30,1	69,9
	P=0,773	
Friablility		
Yes	26,0	74,0
No	31,6	98,4
	P=0,379	
Cervical motion tenderness		
Yes	31,6	68,4
No	29,7	70,3
	P=0,813	
Visual inspection with acetic acid (VIA)		
Positive	34,3	65,7
Negative	28,6	71,4
	P=0,497	
Visual inspection with Lugol's iodine (VILI)		
Positive	29,6	70,4
Negative	29,1	70,9
	P=0,946	
Vaginosi		
Positive	31,8	68,2
Negative	29,0	71,0
	P=0,783	
<i>Trichomonas vaginalis</i>		
Positive	28,6	71,4
Negative	29,3	70,7
	P=0,967	
Pap test results		
Normal	28,1	71,9
Inflammatory	34,1	65,9
ASCUS	0	100,0
HPV	100,0	0
NIC I	40,0	60,0
NIC II	100,0	0
Inconclusive	25,5	75,0
	P=0,362	
Colposcopy		
Normal	29,7	70,3
Abnormal	41,7	58,3
	P=0,379	

Figure 1. HPV genotypes identified by sequencing



* HPV genotypes not identified.

**Uncommon non-oncogenic HPV genotypes prevalence, *TP53* and *MDM2*
genes polymorphisms in Brazilian HIV-positive women**

Ludmila Gonçalves Entiauspe, Fabiana Kömmling Seixas, Emily Montosa
Nunes, Fernanda Martins Rodrigues, Tiago Collares, Odir A. Dellagostin,
Mariângela Freitas da Silveira

Manuscrito formatado nas normas do periódico *Journal of Medical Virology*

Uncommon non-oncogenic HPV genotypes prevalence, *TP53* and *MDM2* genes
polymorphisms in Brazilian HIV-positive women

Ludmila Gonçalves Entiauspe¹, Fabiana Kömmling Seixas², Emily Montosa Nunes³,
Fernanda Martins Rodrigues³, Tiago Collares², Odir A. Dellagostin⁴, Mariângela Freitas
da Silveira⁵

¹Biologist. Functional Genomics Laboratory, Technology Development Centre (CDTec), Federal University of Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, 96010-900, Brazil.

²Biologist. Post-Graduate Programme in Biotechnology, UFPel, Pelotas, RS, 96020-220 Brazil.

³Graduate student in Biotechnology, CDTEC, UFPel, Pelotas, RS, 96010-900, Brazil.

⁴Veterinaty. Post-Graduate Programme in Biotechnology, UFPel, Pelotas, RS, 96020-220 Brazil.

⁵Medical Doctor. Post-Graduate Programme in Epidemiology, UFPel, Pelotas, RS, 96020-220 Brazil.

Corresponding author: Mariângela Freitas da Silveira, Centro de Pesquisas Epidemiológicas, Rua Marechal Deodoro, 1160 - 3º Piso, Bairro Centro, Cep: 96020-220 - Caixa Postal 464– Pelotas city, RS – Brazil. Tel/fax +55 (53) 3284 – 1300. Email adress: maris.sul@terra.com.br

Running title: HPV infection characteristics in HIV+ women

ABSTRACT

The Human Papillomavirus (HPV) infection is most common in women with Human Immunodeficiency Virus (HIV) and it is believed that HIV infection contributes to the increase viral load and consequently HPV persistence, increasing the risk for the cervical intraepithelial injuries. Several factors may contribute to cervical cancer (CC) development, including genetic variants such *TP53* and *MDM2* genes polymorphisms. Some authors have associated CC development risk with the Arg72Pro *TP53* SNP, among women infected with oncogenic HPV genotypes. The *MDM2* SNP referred as SNP309 may also be implicated in CC risk in association with high-risk HPV genotypes. A hundred HIV-positive women were examined, for HPV detection and its genotypes, as well as the frequencies of the SNPs Arg72Pro and SNP309 and their associations with CC risk factors. The HPV detection was realized by Nested Polymerase Chain Reaction (nPCR) using the MY09/11 and GP5/6 primers, and PCR-RFLP for *TP53* and *MDM2* SNP309 genotyping. The HPV genotypes were identified by sequencing and the statistical analysis was performed by using the SPSS 16.0® software. HPV DNA was detected in 68% of the samples. A higher frequency for the low-risk HPV genotypes (66.7%) was observed when compared to the high-risk genotypes (33.3%). Nine different HPV genotypes were identified, with the highest prevalence for the HPV-6, followed by the HPV-16 and -31. The p53 Arg72Arg and the SNP309 TG genotype were the most prevalent. The data obtained suggest that HIV-infected women are more susceptible to be infected by the low-risk HPV (LR-HPV) genotypes than by the high-risk (HR-HPV), and Pro72Pro of *TP53* gene and TG of *MDM2* SNP309 genotypes apparently seems to be a protective factor among HIV positive women for HPV acquisition and HR-HPV infection, respectively. These

findings suggest that future investigations in larger populations are necessary – and of interest – to better understand the potential roles of these SNPs and the behavior of non-oncogenic HPV genotypes front to HIV-mediated immunosuppression cases.

Keywords: HPV infection, HIV infection, cervical cancer, epidemiology

INTRODUCTION

Is estimated that cervical cancer (CC) is the second most common type of cancer in the Brazilian female population and the third cause of death in women (MS, 2011). With the introduction of biomolecular techniques, it was possible to confirm that the CC development is closely associated with the Human Papillomavirus (HPV) presence and persistence [Fernandes *et al.*, 2004], with HPV DNA detected in up to 99.7% of invasive CC cases across the world [Sellors *et al.* 2003]. This data shows the significance of the HPV infection for the dysplasia development and the transformation of normal cervical cells into cancerous cells [Munoz *et al.* 2006]. The World Health Organization attributes to cervical infection with HPV-16 or -18 about 70% of invasive CC cases in Brazil [WHO, 2007]. For the years 2011 and 2012, the Brazilian National Cancer Institute estimates a cervical cancer incidence in Brazil of 17.540, with an estimated risk of 17 cases per each 100,000 women [MS, 2011].

Although HPV infection is now considered a necessary cause for cervical cancer development, it alone is not a sufficient cause [Munoz *et al.* 2006]. The association of HPV infection with risk factors, such as young age, high number of sexual partners throughout life, early sexual debut, high parity, smoking, low socioeconomic status, genetics variants, among others, is related to the cervical intraepithelial neoplasia (CIN) development and cervical cancer [Da Silva *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2006; Wang *et al.*,

2010]. Moreover, co-infections, such as those caused by the Human Immunodeficiency Virus (HIV) and the *Chlamydia trachomatis* bacterium, may be involved as co-factors to cervical cancer development, acting as adjuvants of the neoplastic process [Fernandes et al., 2004; Golijow et al. 2005].

The polymorphism on codon 72 (Arg72Pro) of *TP53* tumor suppressor gene has been extensively investigated for association with a wide range of cancers worldwide [Lima et al. 2006]. In HPV-infected cells, the E6 oncoprotein binds to p53 protein and promotes its degradation through an ubiquitin proteolytic system altering the p53 activity in some processes, such as tumorigenesis, transcription regulation, telomerase activation, and apoptosis, thus resulting in deregulation of the cell cycle [Munoz et al. 2006]. Previous studies have shown that the Arg72Arg genotype is related to a higher risk for cervical cancer development when compared to the Pro72Pro genotype [Storey et al. 1998]. This data suggests that the genotyping of Arg72Pro alleles in patients with squamous intraepithelial lesion (SIL) may allow selection of patients with high risk for invasive cervical cancer, since is believed that SIL is a premalignant lesion which leads to invasive cancer [Yamashita et al. 1999].

In situations where there is no cellular stress, the Murine Double Minute-2 (MDM2) protein negatively regulates the p53 expression levels. The MDM2 encodes an ubiquitin-protein ligase (E3), leading to the proteasomal degradation of p53, thus acting as a transcriptional inactivator of this tumor suppressor. Studies have shown that a Single Nucleotide Polymorphism (SNP) on promoter region of MDM2 gene, the SNP309 (T to G change on nucleotide 309 of the first intron) results in a higher level of MDM2 mRNA and MDM2 protein, and consequent reduction of the p53 pathway [Bond et al. 2004]. The SNP309 occurs at a relatively high frequency in the general

population, and it was shown that it presents a strong association with HPV-mediated cervical carcinogenesis [Nunobiki et al. 2010].

Based on the presented data, this study aimed to investigate the HPV infection spectrum, to identify the most prevalent genotypes, to determine the frequencies of the SNPs Arg72Pro and MDM2 SNP309, and its association with possible risk factors for viral persistence and for the development of pre-neoplastic and neoplastic lesions of the uterine cervix in HIV-infected women. The study was conducted in patients of the Service of Specialized Care for HIV / AIDS, College of Medicine, Federal University of Pelotas (*Serviço de Assistência Especializada em HIV/SIDA - SAE-UFPel*).

MATERIALS AND METHODS

Study type, characterization and sample size

This is a cross-sectional study consisting of 100 HIV-infected women, which were sequentially randomly invited to participate. The eligibility criteria were: not being in the menstrual period, age between 18 and 45 years and not being pregnant. The exclusion group consisted of those patients who underwent cervical conization and hysterectomy. The Epi-Info 6.0 software was used to determine the sample size for the prevalence study, using an estimated HPV prevalence of 80%, with a 95% confidence level and 80% testing power.

.Logistics

All participants completed a standardized enclosed questionnaire with the purpose of obtaining information about the patient as well as other relevant epidemiological and socio-demographic information. An adapted questionnaire from an intervention study with HIV-positive (HIV+) women realized at SAE-UFPel [da

Silveira and dos Santos 2006] was used. The Research Ethics Committee of the College of Medicine of the Federal University of Pelotas approved the present study by June 2009, and informed consent was obtained from all participants. All procedures were realized according with the guidelines of the Helsinki Declaration.

Sample collection and DNA extraction

Cytobrushes were collected containing cervical secretions samples from the endocervical region. The collected samples were stored in eppendorf tubes containing 300µL of Cellular Lysis Solution (PUREGENE™Gentra Systems Kit) and routed in an appropriated container to the Laboratory of Functional Genomics (Center for Technology Development – CDTec-UFPel) for the virus molecular detection by Polymerase Chain Reaction (PCR). The samples were subjected to enzymatic digestion with 1,5µl of Proteinase K (10mg/ml) and incubated for 16 hours at room temperature. The extracted DNA was performed according to manufacturer's specifications.

TP53 gene polymorphism analysis

The Arg72Pro polymorphism of *TP53* gene was analyzed by PCR using the 72A and 72S primers described by LIN *et al.* [2008]. The amplification conditions consisted of an initial denaturing at 94°C for 3 minutes followed by 40 cycles at 94°C for 30 seconds, 57°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds and a final extension at 72°C for 3 minutes [Lin et al. 2008].

The PCR product obtained was subjected to enzymatic digestion by RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) using the *Bst* UI restriction enzyme [Ara et al. 1990] for the restriction fragments analysis. The fragments obtained were analyzed by agarose gel electrophoresis (2.5% agarose in TBE buffer), stained with GelRed™

(Biotium Inc., CA) and observed under ultraviolet light (UV). The p53 genotypes were characterized according Lin et al. (2008).

MDM2 SNP309 analysis

The MDM2 T/G SNP309 polymorphism was analyzed by PCR using the primers described by Sotomaa et al. [2005]. The reaction was performed with initial denaturing at 94°C for 10 minutes followed by 30 subsequent cycles at 94°C for 30 seconds, 60°C for 1 minute and 72°C for 1 minute and a final extension at 72°C for 10 minutes. The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis (2% agarose gel in TBE buffer), stained with GelRedTM (Biotium Inc., CA) and observed under UV. The genotyping was performed by RFLP using the *MspA1* I restriction enzyme [Sotamaa et al. 2005].

HPV DNA detection by PCR

The HPV DNA detection was realized by the Nested Polymerase Chain Reaction (nPCR) technique, which is performed in two stages. The first stage used a pair of external primers (MY09/11) previously described by Manos *et al.* [1989], and the second stage used a pair of internal primers (GP5/6) described by Snijders *et al.* [1990]. Both reactions were performed with initial denaturing at 95°C during 9 minutes and final extension at 72°C for 5 minutes [Gravitt et al. 2000; Husnjak et al. 2000]. The reaction conditions for the first stage consisted of 40 subsequent cycles of 94°C during 30 seconds for denaturation, 45°C during 30 seconds for annealing and 72°C for 30 seconds for extension. For the second stage, were used 40 subsequent cycles of 95°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 1 minute for denaturation, annealing and extension, respectively [Husnjak et al. 2000]. The PCR products obtained were

subjected to agarose gel electrophoresis (1,0% and 2,0% agarose for the first and second rounds, respectively) and observed under UV [Molijn et al. 2005]. As controls of the reaction, was used a reaction positive control (RPC), which consisted of a 450pb corresponding to HeLa cells (HPV-16), and a negative control (NC) without any DNA.

Sequencing of the PCR products

The HPV DNA-positive samples were sequenced for identification of the present genotypes. The products obtained from nPCR were purified using the Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Health Care) and sequenced on a MegaBACE 500 (GE Healthcare).

Sequences analyses

Forward and reverse sequences were aligned and a consensus sequence was obtained for each case using VECTOR NTI® 10.0 software. The genotypes were determined comparing the consensus sequence with reference sequences deposited in DNA databases through the nucleotide Basic Local Search Tool (BLASTn). For the samples edition and alignment, the VECTOR NTI® 10.0 software was used.

Results analyzes

Data was entered by two different data clerks with the software Epi-Info ® Windows version in order to make a further comparison and, thus, ensure better data quality. An automatic data checking was performed at the time of typing using the Epi-Info® *Check* function for consistency and amplitude checking. To identify and correct coding, proofreading and typing inconsistencies, a data cleaning was performed by obtaining frequencies of the collected variables by the SPSS ® v16.0 software. The analysis was performed using the SPSS ® v16.0 software. Chi-square tests (χ^2) were used for the bivariate analyzes. Multivariate analysis was performed using logistic

regression. Variables remained at the model if their level of significance was below 0.20, as potential confounders for the next level. A P-value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Most participants were aged between 40 and 45 years (53%), have white skin color (51%), between 5 and 8 years of education (45.3%), were married or in a stable relationship (64.4%), and had per capita income of one minimum wage (96.6%). Regarding behavioral variables, 59.6% were non-smokers, 60% reported not having consumed alcohol in the last four weeks, 63.3% reported having used a condom at last sexual intercourse, 56% were aged between 12 and 15 years at sexual debut, 40.8% had more than nine sexual partners throughout life, and over 90% reported never had exchanged sex for money and/or drugs.

The *TP53* genotyping showed that, between the 100 samples analyzed, 43% presented Arg72Pro genotype, 39% were Arg72Arg and 18% were Pro72Pro. The alleles frequency showed 82% for the A (AA+AP) allele and 61% for the P (AP+PP) allele. The MDM2 SNP309 genotyping showed a higher frequency for the TG genotype (45%). Moreover, the T (TT+TG) allele was the most frequent (84%) compared to the G (GG+TG) allele (61%). The HPV infection was observed in 68% of the samples. Nine different HPV genotypes were found, with a higher prevalence for the HPV-6, followed by HPV-16, HPV-31, HPV-11, HPV-18, HPV-35, HPV-45, HPV-56 and HPV-81. Eleven samples could not be genotyped by sequencing, and these were categorized as HPV-X. According to the epidemiologic classification of HPV types associated with cervical cancer (Muñoz *et al.*, 2003), 33.3% of the samples presented

high-risk oncogenic HPV (HR-HPV) and 66.7% presented low-risk oncogenic HPV (LR-HPV).

Table 1 shows the bivariate analysis, having the HPV infection as outcome related to the socioeconomic, demographic and behavioral variables. There was no statistically significant association with any of the variables. Table 2 shows the frequency distribution of genotypes and alleles of Arg72Pro and MDM2 SNP309. The Arg72Arg genotype for the *TP53* gene was most prevalent for the HPV+ group (45.6%), such as the A (AA+AP) allele (82.4%) when compared to the P (AP+PP) allele (54.4%). The MDM2 SNP309 presented the TG genotype as the most prevalent (50%), as well as the T (TT+TG) allele (83.8%) when compared to the G (GG+TG) allele (66.2%). The LR-HPV infected group showed frequencies similar to those shown by the HR-HPV infected group, except for some variables. Regarding the *TP53* gene polymorphism, it was observed that 52.6% of the HR-HPV infected samples and 47.4% of the LR-HPV infected samples presented the Arg72Arg genotype. In addition, the A (AA+AP) allele was more frequent in both infections (LR and HR) when compared to the P (AP+PP) allele ($p < 0.05$). Furthermore, the MDM2 SNP309 genotyping showed a higher frequency for the TT genotype (42,1%) in the HR-HPV group, as well as a higher frequency for the TG genotype (65,8%) in the LR-HPV group ($p < 0.05$). The T (TT+TG) allele was more frequent when compared to the G (GG+TG) allele for both groups.

The multivariate analyzes showed no statistically significant differences and their results were not included in the study.

DISCUSSION

Studies have shown that HPV infection is most common in HIV+ women and it is believed that the HIV contributes to increase in HPV viral load and hence its persistence, increasing the risk for cervical intraepithelial lesions [Luque et al. 2006]. The HPV infection prevalence in this study was 68%. These observations are consistent with a meta-analysis study realized by Clifford *et al.* [2006], who observed higher HPV prevalence in HIV+ women in Brazil and Mexico (57.3%) compared to the global average (36.5%).

It was observed in this study that women older than age 40, with low income, early sexual debut and high number of sexual partners throughout life showed a greater tendency to HPV infection. Sauvaget *et al.* [2011], in a study realized with women from rural area of India, found an association with an average age of 39 years, low income, early age at first pregnancy, and low educational level. They suggested that constant increase in HPV prevalence in middle-aged women may result in a reduced ability of the host to eliminate HPV infection, nutritional deficiencies, or in the virus ability to become latent and be reactivated due to a reduction related to immune surveillance or hormonal factors associated to an older age. Moreover, the HR-HPV prevalence usually shows a constant decline with the age increasing in high-income countries, while was reported by U-shaped curves, in some Latin-American countries, an increased prevalence of HPV infection in the age-group of 35 to 44 years old, as observed in a transversal study performed in eleven different countries with different cervical cancer incidences [Franceschi et al. 2006].

The genotyping by sequencing showed the presence of nine different HPV genotypes, with a higher prevalence for HPV-6, followed by HPV-16 and -31 in this study. Although most studies show that the HPV-16 genotype is the most prevalent

worldwide [Clifford et al. 2006], this data is according with Corrêa *et al.* [2011], who observed a prevalence of 63,9% for the HPV-6 genotype, and the HPV-16 genotype as the second most prevalent (48.5%). Levi *et al.* [2004] observed similar data, with a higher prevalence for the HPV-6 genotype in HIV+ women (87%). McKenzie *et al.* [2010], in a meta-analyses study, observed that different geographic areas, such as Zambia, Brazil and Rochester (New York, United States), show different HR-HPV infections by less prevalent genotypes when compared to the population in general. Furthermore, they show that cervical malignancy has a different behavior in HIV infected patients, as well as benign manifestations of HPV.

Apparently, the HIV infection exerts a multifactorial oncogenic function in the cervical cancer development, interfering in the immune function and also in the direct promotion of the lesion development. The HIV-1 Tat protein seems to promote the cellular proliferation and positively regulate the E6 and E7 HPV genes, responsible for the malignant cellular transformation [Buonaguro et al. 1994; Nyagol et al. 2006]. Recent data indicates that significant changes occur in the uterine cervix in HPV/HIV co-infected women suggesting that the immune response appears to be negatively regulated, except for the RANTES protein (Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted), which has been found increased [Nicol et al. 2008]. RANTES levels were found significantly increased in plasma and tissue from patients with carcinomas of breast cancer and cervical cancer, suggesting that positive regulation of RANTES and other changes in cervical tissue associated with HPV/HIV co-infection (such as those mediated by HIV-1 Tat protein) would permit less aggressive HPV genotypes to cause malignant transformation [Niwa et al. 2001]. Some authors suggest that this variation of genotypes is due to socioeconomic and behavioral characteristics,

which may be different in HIV+ women, besides the geographic region where the research is conducted [Palefsky et al. 1999]. With regard to HPV infection stratified by genotype, further studies comparing innate immunity between HIV+ and HIV- women are necessary. These studies will help to treatment and prevention individualization for the group of women at increased risk of morbidity and mortality by HPV-related diseases.

Regarding the neoplastic potential of HPV, it was observed a higher frequency of LR-HPV genotypes (69,4%) when compared to HR-HPV genotypes. This was also observed in previous studies, suggesting that immune system deficiency HIV-mediated would contribute to HPV genes expression due to a local immunosuppression, which would result in a deficient immune surveillance, increasing susceptibility to the acquisition, prevalence and manifestation of lesions caused by non-oncogenic HPV eliminated in 90% of cases of infection in people with competent immune system [Arany and Tyring 1998;Arany et al. 1998]. The ability of the persistent HPV infection to cause malignant transformation is associated to the viral DNA integration into the genome of the host [Cullen *et al.*, 1991]. However, some studies have challenged this affirmation. These studies indicate that the necessity of integration for the carcinogenesis varies with the HPV genotype (for example, only 50% of the HPV-16 genome integrates with the host, while HPV-18 needs to integrate 94%) [Hudelist et al. 2004]. This distinction is particularly important for the comprehension of the disease etiology in HIV infected patients, since these are commonly infected by HPV genotypes that require integration with the host genome for the carcinogenesis development. Furthermore, recent studies have described the association between the integration rate and the cervical dysplasia severity [Wanram et al. 2009].

Concerning the Arg72Pro *TP53* gene polymorphism, the present study found no statistically significant relation between observed genotypes, frequency of the Arg and Pro alleles and HPV presence. However, a higher frequency was observed for the Arg72Arg genotype in HR-HPV positive samples, as well as in LR-HPV positive samples, as related by Storey *et al.* [1998] who found a seven times increased risk for CC in Arg72Arg patients when compared to the other genotypes. The results obtained with this study can be compared to previous studies, which also failed to correlate the Arg72Pro polymorphism with the risk for cervical cancer. Nishikawa *et al.* [2000], in a study realized with samples from cancer tissues, dysplasia and cervical condyloma, found no statistically significant differences for the p53 genotypes distribution among patients with these malignancies, regardless of HPV status. In a meta-analyses study about the Arg72Pro polymorphism of p53 protein, Klug *et al.* [2009] also demonstrated no statistically significant differences for the *TP53* gene genotypes distribution among patients with cervical diseases. A recent study conducted by Nunobiki *et al.* [2011] using normal cervical samples and high and low-risk lesion samples also failed to associate the presence of the polymorphism and frequency of the Arg and Pro alleles with increased risk for CC. This data suggests that the association between the *TP53* gene polymorphism and the development of cervical neoplasia HPV-associated is improbable. However, it is worth noting that the controversial results regarding the association between *TP53* gene polymorphism and cervical cancer can occur due to some factors, such as differences in the *TP53* polymorphism among ethnical groups, sample size, choice of the control to be used and DNA obtaining source [Hu *et al.* 2010].

There are a few studies correlating MDM2 SNP309 to cervical cancer susceptibility, although SNP309 presents a relatively high frequency in the general population and its presence has been associated with the acceleration of tumorigenesis and time of tumor onset [Bond *et al.*, 2004]. Through this study, was possible to determine on a statistically significant way that the TT and TG genotypes are more frequent in the HR-HPV and LR-HPV groups, respectively, but not when compared to the HPV presence or frequency of the T and G alleles. There is an inconsistency regarding the role of MDM2 SNP309 in susceptibility to the cervical cancer development. Nunobiki *et al.* [2011] found a prevalence of 78.8% for the TG genotype among High-grade Squamous Intraepithelial Lesion (HSIL) samples when compared with Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion (LSIL) samples and controls, among HR-HPV positive samples and, specially, the HPV-16 and -18 genotypes. However, there was no association between the samples and the frequencies of T and G alleles. Meissner *et al.* [2007], in a study conducted in Northeastern Brazil for identification of the MDM2 SNP309 in 72 CC samples and 100 normal samples by PCR, found no statistically significant association between the SNP309 and the risk and early diagnosis for CC. Also, no difference was observed for the frequency of alleles or genotypes among the group of patients diagnosed for CC at an early age (below 40 years) and the group of older patients. On the other hand, Arvantis and Spandidos [2008], through the analysis of mRNA expression profiles of 24 G1- and S-phase checkpoint genes in 35 cervical carcinomas samples, 26 HSIL samples, 33 LSIL samples and 28 normal cervical samples (used as controls), showed that the MDM2 was found positively regulated in SIL, suggesting that MDM2 gene is a potential candidate for the cervical neoplasia development. Although this data suggests that HR-HPV infection and the

MDM2 SNP309 may be associated with cervical carcinogenesis, in our study there were no samples from patients with CC, which can be considered a limiting factor for these two associations types, since the polymorphisms of both MDM2 and *TP53* genes are associated with increased risk for CC and not with susceptibility to HPV infection.

CONCLUSION

Current recommendations are partly based on the knowledge of professionals about the CC management and HIV infection in women. A better understanding of the HPV infection evolution in these women, the viral persistence occurrence, and possible factors associated to the malignant cervical lesions development is necessary for the establishment of more appropriate cervical cancer screening routines in this population. This is essential for the proposition of more appropriated monitoring strategies and treatment according to the Brazilian health service reality, as well as patients. In this study, Pro72Pro of *TP53* gene and TG of MDM2 SNP309 genotypes apparently seems to be a protective factor among HIV positive women for HPV acquisition and HR-HPV infection, respectively. Moreover, further studies are necessary for the investigation of the behavior of low-risk genotypes front to HIV-mediated immunosuppression cases.

Acknowledgements:

The authors are grateful to Brazilian National Research Council (CNPq).

Conflict of Interest:

None declared.

REFERENCES

- Ara S, Lee PS, Hansen MF, Saya H. 1990. Codon 72 polymorphism of the P53 gene. *Nucleic Acid Res* 18(16):4961.
- Arany I and Tyring SK. 1998. Systemic immunosuppression by HIV infection influences HPV transcription and thus local immune responses in condyloma acuminatum. *International Journal of STD and AIDS*, 9:268-27.
- Arany I, Evans T, Tyring SK. 1998. Tissue specific HPV expression and downregulation of local immune responses in condylomas from HIV seropositive individuals. *Sexually Transmitted Infections*, 74:349-353.
- Arvanitis DA, Spandidos, DA. 2008. Deregulation of the G1/S phase transition in cancer and squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: a case control study. *Oncol Reports*, 20(4):751–760.
- Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, Bargonetti J, Bartel F, Taubert H, Wuerl P, Onel K, Strong LC, Lozano G, Levine AJ. 2004. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell* 119:591-602.
- Buonaguro FM, Tornesello ML, Buonauguro L, Delgaudio E, Beta-Giraldo E, Giraldo G. 1994. Role of HIV as cofactor in HPV oncogenesis: in vitro evidence of virus interactions. *Antibiot Chemother*, 46:102–9.
- Clifford GM, Gonçalves MAG, Franceschia S. 2006. Human papillomavirus types among women infected with HIV: a meta-analysis for the HPV and HIV Study Group. *AIDS*, 20(1):2337-44.

- Corrêa CM, Teixeira NCP, Araujo, ANL de, Carvalho NO, Castillo DM del, Campos RR, Oliveira IV, Alves AR, França AFM, Melo VH. 2011. Prevalence and multiplicity of HPV in HIV women in Minas Gerais, Brazil. *Rev Assoc Med Bras*, 57(4):425-430.
- Cullen AP, Reid R, Campion M, Lorincz AT. 1991. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol*, 65:606–12.
- Da Silva TT, Guimarães ML, Barbosa MIC, Pinheiro MFG, Maia AF. 2006. Identification of papillomavirus types and other risk factors for cervical intraepithelial neoplasia. *Rev Bras Ginecol Obstet* 28(5): 285-291.
- De Lima JL, Serafim PVP, Da Silva IDC, Forones NM. 2006. Role of the genetic polymorphism of p53 (codon 72) gene in colorectal cancer. *Arq Gastroenterol* 43(1):8-13.
- Fernandes APM, Gonçalves MAG, Simões RT, Quintana SM, Duarte G, Donadi EA. 2004. Influence of HIV-1 infection on the presence of HPV in uterine cervix lesions. *J Bras Doenças Sex Transm* 16(1):21-25.
- Franceschi S, Herrero R, Clifford GM, Snijders PJF, Arslan A, Anh PTH, Bosch FX, Ferreccio C, Hieu NT, Lazcano-Ponce E, Matos E, Molano M, Qiao YL, Rajkumar R, Ronco G, Sanjosé S de, Shin HR, Sukvirach S, Thomas JO, Meijer CJLM, Muñoz N, IARC HPV Prevalence Surveys Study Group. 2006. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int J Cancer* (119):2677-2684.

- Golijow CD, Abba MC, Mouron SA, Laguens RM, Dulout FN, Smith JS. 2005. Chlamydia trachomatis and Human papillomavirus infections in cervical disease in Argentine women. *Ginecol Oncol* 96:181-186.
- Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ. 2000. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 38 (1): 357-361.
- Hu X, Zhang Z, Ma D, Huettner PC, Massad LS, Nguyen L, Borecki I, Rader JS. 2010. TP53, MDM2, NQO1, and susceptibility to cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19:755-761.
- Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, Watkins-Riedel T, Singer CF, Kubista E, Czerwenka KF. 2004. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol*, 92(3):873-80.
- Husnjak K, Grce M, Magdic L, Pavelic K. 2000. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J. Virol Meth* (88)125-134.
- Klug SJ, Rensing M, Koenig J, Abba MC, Agorastos T, Brenna SMF, Ciotti M, Das BR, Mistro AD, Dybikowska A, Giuliano AR, Gudleviciene Z, Haews ALF, Helland A, Herrington CS, Hildesheim A, Humbey O, Jee SH, Kim JW, Madeleine MM, Menczer J, Ngan HYS, Nishikawa A, Niwa Y, Pegoraro R, Pillai MR, Ranzani G, Rosenthal AN, Roychoudhury S, Saranath D, Schmitt VM, Sengupta S, Settheetham-Ishida W, Shirasawa H, Snijders PJ, Stoler MH, Suárez-Rincón AE, Szarka K, Tachezy R, Ueda M, van der Zee AG, von Knebel Doeberitz M, Wu

- MT, Yamashita T, Zehbe I, Blettner M. 2009. TP53 codon 72 polymorphism and cervical cancer: a pooled analysis of individual data from 49 studies. *The Lancet Oncol*, 10(8):772-784.
- Levi JE, Fernandes S, Tateno AF, Motta E, Lima LP, Eluf-Neto J, Pannuti CS. 2004. Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. *Gynecol Oncol*, 92(1): 225-31.
- Lin YC, Huang HI, Wang LH, Tsai CC, Lung O, Dai CY, Yu ML, Ho CK, Chen CH. 2008. Polymorphisms of COX-2 -765G>C and p53 codon 72 and risks of oral squamous cell carcinoma in a Taiwan population. *Oral Oncol* 44: 798-804.
- Luque AE, Jabeen M, Messing S, Lane CA, Demeter LM, Rose RC, Reichman RC. 2006. Prevalence of human papillomavirus genotypes and related abnormalities of cervical cytological results among HIV-1-Infected Women in Rochester, New York. *J Infect Dis*, 194(1):428-34.
- Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. 1989. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells*, 7:209-214.
- Meissner RV, Barbosa RN, Fernandes JV, Galvão TM, Galvão AF, Oliveira, GH. 2007. No association between SNP309 promoter polymorphism in the MDM2 and cervical cancer in a study from northeastern Brazil. *Cancer Detect Prev*, 31:371-374.
- Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. 2005. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections *Journal of Clinical Virology* 32S:S43-S51.

- MS – Ministério da Saúde do Brasil - Instituto Nacional do Câncer (INCA). 2011. Estimativas 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. 94p.
- Muñoz N, Bosch FX, Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJF, Meijer CJLM. 2003. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med* 348;6.
- Muñoz N, Castellsagué X, De González AB, Gissman L. 2006. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vac* 24(S3):S3/1-S3/10.
- Nicol AF, Nuovo GJ, Salomão-Estevez A, Grinsztejn B, Tristão A, Russomano F, Lapa e Silva JR, Oliveira MP, Pirmez C. 2008. Immune factors involved in the cervical immune response in the HIV/HPV co-infection. *J Clin Pathol*, 61(1):84-8.
- Nishikawa A, Fujimoto T, Akutagawa N, Iwasaki M, Takeuchi M, Fujinaga K, Kudo R. 2000. p53 polymorphism (codon-72) has no correlation with the development and the clinical features of cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 10(5):402-407.
- Niwa Y, Akamatsu H, Niwa H, Sumi H, Ozaki Y, Abe A. 2001. Correlation of tissue and plasma RANTES levels with disease course in patients with breast or cervical cancer. *Clin Cancer Res*, 7:285-9.
- Nunobiki O, Ueda M, Yamamoto M, Toji E, Sato N, Izuma S, Okamoto Y, Torii K, Noda S. 2010. MDM2 SNP 309 human papillomavirus infection in cervical carcinogenesis. *Gynecol Oncol* 118(3):258-261.
- Nyagol J, Leucci E, Onnis A, DeFalco G, Tigli C, Sanseverino F. 2006. The effects of HIV-1 Tat protein on cell cycle during cervical carcinogenesis. *Cancer Biol Ther*, 5(6): 684-90.

- Palefsky JM, Minkoff H, Kalish LA, Levine A, Sacks HS, Garcia P, Young M, Melnick S, Miotti P, Burk R. 1999. Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. *Journal of National Cancer Institute*, 91:226–236.
- Sauvaget S, Nene BM, Kelkar R, Malvi SG, Shastri SS, Sankaranarayanan R. 2011. Prevalence and determinants of high-risk human papillomavirus infection in middle-aged indian woman. *Sex Transm Dis* 28(10):902-906.
- Sellers JW, Karwalajtys TL, Kaczorowski J, Mahony JB, Lytwyn A, Chong S, Sparrow J, Lorincz A. 2003. Incidence, clearance and predictors of human papillomavirus infection in women. *Can Med Assoc J* 168(4):421-425.
- Silveira MF, Santos IS. 2006. Impact of an educational intervention to promote condom use among the male partners of HIV positive women. *J Eval Clin Pract* 12: 102-111.
- Snijders PJF, Van Den Brule AJC, Schrijnemakers HFJ, Snow G, Meijer CJLM, Walboomers JMM. 1990. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol* 71:173-181.
- Sotamaa K, Liyanarachchi S, Mecklin JP, Jarvinen H, Aaltonen LA, Peltomaki P, de la Chapelle A. 2005. p53 codon 72 and MDM2 SNP309 polymorphisms and age of colorectal cancer onset in Lynch syndrome. *Clin Cancer Res* 11:6840-6844.
- Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L. 1998. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 393: 229-234.

- Wang SS, Gonzalez P, Yu K, Porras C, Li Q, Safaeian M, Rodriguez AC, Sherman ME, Bratti C, Schiffman M, Wacholder S, Burk SD, Herrero R, Chanock SJ, Hildesheim A. 2010. Common Genetic Variants And Risk For Hpv Persistence And Progression To Cervical Cancer. *Plos One* 5, e8667.
- Wanram S, Limpai boon T, Leelayuwat C, Yuenyao P, Guiney DG, Lulitanond V, Patcharee J. 2009. The use of viral load as a surrogate marker in predicting disease progression for patients with early invasive cervical cancer with integrated human papillomavirus type 16. *Am J Obstet Gynecol* 201(1):79-e1.
- WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). 2010. Summary report on HPV and cervical cancer statistics in Brazil. 28p.
- Yamashita T, Yaginuma Y, Saitoh Y, Kawai K, Kurakane T, Hayashi H, Ishikawa M. 1999. Codon 72 polymorphism of p53 as a risk factor for patients with human papillomavirus-associated squamous intraepithelial lesions and invasive cancer of the uterine cervix. *Carcinogenesis* 20(9):1733-1736.

Table 1. Frequency of HPV infection and the oncogenic potential risk among the current variables of HIV positive women.

Variables	HPV infection		
	Positive (%)	Negative (%)	RR (IC 95%)
Age (years)			
18 - 24	2.9	3.1	0.71 (0.06-8.54)
25 - 30	5.9	18.8	0.23 (0.05-0.97)
31 - 35	17.6	15.6	0.86 (0.25-2.88)
36 - 39	16.2	18.8	0.65(0.20-2.11)
40 - 45	57.4	43.8	1
		P = 0.342	
Skin color			
White	55.9	40.6	2.02 (0.82-4.99)
Non-white	44.1	59.4	1
		P=0.155	
Schooling (years)			
> 5	23.1	13.3	2.43 (0.66-8.99)
5 to 8	46.2	43.3	1.50 (0.57-3.89)
> 8	30.8	43.3	1
		P=0.378	
Marital status			
Married/consensual union	63.2	68.8	1
Single	22.1	18.8	0.99 (0.26-3.78)
Separated/divorced/widowed	14.7	12.5	1.35 (0.27-6.67)
		P=0.865	
Per capita Income (minimum wages)			
0 - 1	96.5	96.8	0.91 (0.80-10.53)
2	3.5	3.2	1
		P=0.944	
Family Income (minimum wages)			
Up to 1	29.8	32.3	0.18 (0.02-1.72)
Up to 2	33.3	45.2	0.15 (0.01-1.33)
Up to 3	21.1	19.4	0.22 (0.02-2.18)
Over 4	15.8	3.2	1
		P=0.307	
Cigarette smoking			
Current smoker	41.2	38.7	0.90(0.37-2.15)
No-smoker	58.8	61.3	1
		P=0.817	
Alcohol consume (last 4 weeks)			
At least once a week	17.6	25.0	0.75 (0.26-2.12)
Less than once a week	23.5	12.5	2.00 (0.59-6.77)
Never	58.8	62.5	1
		P=0.375	

Use of condom (last sexual activity)			
Yes	62.7	65.6	1
No	37.3	34.4	0.88(0.36-2.12)
		P=0.776	
Sexual activity began (years)			
< 15	51.5	65.6	1.71 (0.47-6.19)
16 – 18	38.2	15.6	5.19 (1.16-23.17)
≥ 19	10.3	18.8	1
		P=0.062	
Sexual partners (in life)			
Up to 1	3.0	3.1	1
2 – 4	39.4	25.0	1.07 (0.90-12.94)
5 – 8	18.2	28.1	1.75 (0.62-4.87)
≥ 9	39.4	43.8	0.71 (0.24-2.11)
		P=0.497	
Give/received drugs and/or money for sex			
Yes	80.0	20.0	1.93 (0.20-18.07)
No	67.4	32.6	1
		P=0.555	
Last Pap test			
Never	8.6	13.3	0.25 (0.03-1.86)
< 3 years	70.7	76.7	1
> 3 years	20.7	10.0	0.35 (0.07-1.76)
Don't remember	14.7	6.2	0.80 (0.11-5.77)
		P=0.336	
Visual inspection with acetic acid (VIA)			
Positive	10.4	6.7	1.63 (0.31-8.37)
Negative	89.6	93.3	1
		P=0.553	
Visual inspection with Lugol's iodine (VILI)			
Positive	10.4	6.7	1.63 (0.31-8.37)
Negative	89.6	93.3	1
		P=0.553	
Pap test results			
Normal	60.7	65.5	1
Inflammatory	31.1	27.6	0.77 (0.13-4.39)
Altered	8.2	6.9	0.95 (0.15-5.95)
		P=0.905	
CD4 counting cells (cells/mm³)			
< 350	25.4	20.0	0.73 (0.25-2.10)
> 350	76.3	80.0	1
		P=0.565	

Table 2. Frequency distributions of genotypes and alleles of Arg72Pro and MDM2 SNP309 among the HPV infection and oncogenic risk status.

HPV INFECTION	P53 GENOTYPE			P53 ALLELE		MDM2 GENOTYPE			MDM2 ALLELE	
	Arg72Arg N(%)	Arg72Pro N(%)	Pro72Pro N(%)	Arginine carriers N(%)	Proline carriers N(%)	TT N (%)	TG N (%)	GG N (%)	Thymine Carriers N (%)	Guanine Carriers N (%)
Positive	31 (45.6)	25 (36.8)	12 (17.6)	56 (84.2)	37 (54.4)	23 (33.8)	34 (50)	11 (16.2)	57 (83.8)	45 (66.2)
Negative	8 (25)	18 (56.2)	6 (18.8)	26 (81.2)	24 (75)	16 (50)	11 (34.4)	5 (16.2)	27 (84.4)	16 (50)
P		0.11		0.89	0.04		0.26		0.94	0.12
High-risk*	10 (52.6)	6 (31.6)	3 (15.8)	16 (84.2)	9 (47.4)	8 (42.1)	6 (31.6)	5 (26.3)	14 (73.7)	11 (57.9)
Low-risk*	18 (47.4)	14 (36.8)	6 (15.8)	32 (84.2)	20 (52.6)	9 (23.7)	25 (65.8)	4 (10.5)	34 (89.5)	29 (76.3)
P		0.91		1.00	0.70		0.04		0.12	0.15

*Total of 57 samples

7 CONCLUSÕES

- O HPV está fortemente ligado ao câncer cervical, e mulheres HIV positivas apresentam maior susceptibilidade tanto à aquisição, quanto a manifestação maligna do HPV. No grupo estudado, foi observada uma prevalência de infecção por HPV em 30% no grupo HIV negativo e 68% no grupo HIV positivo. O genótipo de HPV mais prevalente no grupo HIV negativo foi o HPV-16, e HPV-6 no grupo HIV positivo. Além destes, outros sete genótipos diferentes foram encontrados (HPVs 31, 11, 18, 35, 45, 56 e 81).
- O SNP Arg72Pro da p53 encontra-se associado ao câncer cervical em diversos estudos. Em ambos os grupos, HIV positivo e negativo, a variante Arg72Arg foi mais prevalente. A frequência alélica foi maior para o alelo A (AA+AP) quando comparada a o alelo P (AP+PP). Nas coinfectadas por HPV, a frequência do Arg72Arg, assim como o alelo A foi mais elevada.
- O SNP309 da MDM2 foi avaliado em mulheres HIV positivas e negativas. Neste estudo, foi observada maior frequência do SNP309 TT para o grupo HIV negativo e TG para HIV positivo. Quando associado ao HPV, o genótipo TG foi o mais prevalente, bem como o alelo T.
- No presente estudo, o polimorfismo dos genes TP53 e MDM2, bem como as variáveis sociodemográficas e comportamentais, não foram associados ao desenvolvimento de câncer cervical mediado por HPV.

REFERÊNCIAS

ARA, S.; LEE, P. S.; HANSEN, M. F.; SAYA, H. Codon 72 polymorphism of the P53 gene. **Nucleic Acid Research**, v.18, p.4961, 1990.

ARANY, I. AND TYRING, S.K. Systemic immunosuppression by HIV infection influences HPV transcription and thus local immune responses in condyloma acuminatum. **International Journal of STD and AIDS**, v.9, p.268-270, 1998.

ARANY, I.; EVANS, T.; TYRING, S. K. Tissue specific HPV expression and downregulation of local immune responses in condylomas from HIV seropositive individuals. **Sexually Transmitted Infections**, v.74, p.349-353, 1998.

ARVANITIS, D. A.; SPANDIDOS, D. A. Deregulation of the G1/S phase transition in cancer and squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: a case control study. **Oncology Reports**, v.20, p.751–760, 2008.

ATWAL, G. S.; BOND, G. L.; METSUYANIM, S.; PAPA, M.; FRIEDMAN, E.; DISTELMAN-MENACHEM, T.; ASHER, E. B.; LANCET, D.; ROSS, D. A.; SNINSKY, J.; WHITE, T. J.; LEVINE, A. J.; YARDEN, R. Haplotype structure and selection of the *MDM2* oncogene in humans. **The National Academy of Sciences of the USA**, v.104, p.4524–4529, 2007.

AYRES, A. R. G.; SILVA, G. A. Cervical HPV infection in Brazil: systematic review. **Revista de Saúde Pública** v.44, p.963-974, 2010.

BEAUDENON, S. AND HUIBREGTSE, J. M. HPV E6, E6AP and cervical cancer, **BMC Biochemistry**, v.9, p.S4, 2008.

BELLANGER, S.; TAN, C. L.; XUE, Y. Z.; TEISSIER, S.; THIERRY, F. Tumor suppressor or oncogene? A critical role of the human papillomavirus (HPV) E2 protein in cervical cancer progression. **American Journal of Cancer Research**, v.1, p.373-389, 2011.

BOND, G. L.; HU, W.; BOND, E. E.; ROBINS, H.; LUTZKER, S. G.; ARVA, N. C.; BARGONETTI, J.; BARTEL, F.; TAUBERT, H.; WUERL, P.; ONEL, K.; YIP, L.; HWANG, S. J.; STRONG, L. C.; LOZANO, G.; LEVINE, A. J. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. **Cell**, v.119, p.591-602, 2004.

BOSCH, F. X.; BURCHELL, A. N.; SCHIFFMAN, M.; GIULIANO, A. R.; DE SANJOSÉ, S.; BRUNI, L.; TORTOLERO-LUNA, G.; KJAER, S. K.; MUÑOZ, N.

Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. **Vaccine**, v.26, p.K1-K16, 2008.

BRENNAN, S. M. F.; SYRJÄNEN, K. J. Regulation of cell cycles is of key importance in human papillomavirus (HPV)-associated cervical carcinogenesis. **São Paulo Medical Journal**, v.121, p.128-132, 2003.

BUONAGURO, F. M.; TORNESELLO, M. L.; BUONAGURO, L.; DELGAUDIO, E.; BETA-GIRALDO, E.; GIRALDO, G. Role of HIV as cofactor in HPV oncogenesis: in vitro evidence of virus interactions. **Antibiotics & Chemotherapy**, v.46, p.102–109, 1994.

CASTELLSAGUÉ, X.; MUÑOZ, N. Chapter 3: Cofactors in Human Papillomavirus Carcinogenesis - Role of Parity, Oral Contraceptives, and Tobacco Smoking. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, v. 31, p.20-28, 2003.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Human Papillomavirus – Associated Cancers - United States, 2004–2008. **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)**, v.61, p.258-261, 2012.

CHAN, P. K.; CHANG, A. R.; YU, M. Y.; LI, W. H.; CHAN, M. Y. M.; YEUNG, A. C. M.; CHEUNG, T. H.; YAU, T. N.; WONG, S. M.; YAU, C. W.; NG, H. K. Age distribution of human papillomavirus infection and cervical neoplasia reflects caveats of cervical screening policies. **International Journal of Cancer**, v.1, p.297-301, 2010.

CHOI, Y. D.; JUNG, W. W.; NAMA, J. H.; CHOI, H. S.; PARK, C.S. Detection of HPV genotypes in cervical lesions by the HPV DNA Chip and sequencing. **Gynecologic Oncology**, v.98, p.369-375, 2005.

CLIFFORD, G. M.; GONÇALVES, M. A. G.; FRANCESCHIA, S. Human papillomavirus types among women infected with HIV: a meta-analysis for the HPV and HIV Study Group. **AIDS**, v.20, p.2337-2344, 2006.

CONWAY, M. J.; MEYERS, C. Replication and assembly of human papillomaviruses. **Journal of Dental Research**, v.88, p.307-317, 2009.

CORRÊA, C. M.; TEIXEIRA, N. C. P.; ARAUJO, A. N. L. DE; CARVALHO, N. O.; CASTILLO, D. M. D.; CAMPOS, R. R.; OLIVEIRA, I. V.; ALVES, A. R.; FRANÇA, A. F. M.; MELO, V. H. Prevalence and multiplicity of HPV in HIV women in Minas Gerais, Brazil. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.57, p. 425-430, 2011.

COX, J. T. The development of cervical cancer and its precursors: what is the role of human papillomavirus infection? **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v.18, p.S5-S13, 2006.

CULLEN, A. P.; REID, R.; CAMPION, M.; LORINCZ, A. T. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. **Journal of Virology**, v.65, p.606–612, 1991.

DA SILVA, T. T.; GUIMARÃES, M. L.; BARBOSA, M. I. C.; PINHEIRO, M. F. G.; MAIA, A. F. Identificação de tipos de papilomavirus e de outros fatores de risco para neoplasia intra-epitelial cervical. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.28, p.285-291, 2006.

DE LIMA, J. L.; SERAFIM, P. V. P.; DA SILVA, I. D. C. G.; FORONES, N. M. Estudo do polimorfismo genético no gene p53 (códon 72) em câncer colorretal. **Archives of Gastroenterology**, v.43, p.8-13, 2006.

DE MOURA GALLO, C. V.; AZEVEDO E SILVA MENDONÇA, DE, M. E.; OLIVIER, M.; HAINAUT, P. TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin America: current knowledge and perspectives. **Mutation Research**, v.589, p.192-207, 2005.

DE SANJOSÉ, S.; ALMIRALL, R.; LLOVERAS, B.; FONT, R.; DIAZ, M.; MUÑOZ, N.; CATALÀ, I.; MEIJER, C. J. L. M.; SNIJDERS, P. J. F.; HERRERO, R. Cervical Human Papillomavirus Infection in the Female Population in Barcelona, Spain. **Sexually transmitted diseases**, v.30, p.788-793, 2003.

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

DE VUYST, H.; NDIRANGU, G.; MOODLEY, M.; TENET, V.; ESTAMBALE, B.; MEIJER, C. J. L. M.; SNIJDERS, P. J. F.; CLIFFORD, G.; FRANCESCHI, S. Human papillomavirus prevalence in invasive cervical carcinoma by HIV Status. **Infect Agents and Cancer**, v.7, p.O12, 2012.

DELUCA, G. D.; BASILETTI, J.; SCHELOVER, E.; VÁSQUEZ, N. D.; ALONSO, J. M.; MARÍN, H. M.; LUCERO, R. H.; PICCONI, M. A. *Chlamydia trachomatis* as a probable cofactor in human papillomavirus infection in aboriginal women from northeastern Argentina. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.15, p.567-572, 2011.

DEMATHE, A.; BERNABÉ, D. G.; GARCIA, J. F.; NUNES, C. M.; MIYAHARA, G. I. Comparação entre dois métodos de detecção de DNA de papilomavírus humano em carcinoma epidermoide de lábio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.46, p.85-90, 2010.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*, v.32, p.S7-S15, 2005.

DUMAY, A.; FEUGEAS, J. P.; WITTMER, E.; LEHMANN-CHE, J.; BERTHEAU, P.; ESPIÉ, M.; PLASSA, L. F.; COTTU, P.; MARTY, M.; ANDRÉ, F.; SOTIRIOU, C.; PUSZTAI, L.; DE THÉ, H. Distinct tumor protein *p53* mutants in breast cancer subgroups. **International Journal of Cancer**, v.132, p.1227-1231, 2013.

DUMONT, P.; LEU, J.I-JU.; PIETRA, A. C. D.; GEORGE, D. L.; MURPHY, M. The codon 72 polymorphic variants of *p3* have markedly different apoptotic potential. **Nature Genetics**, v.3, p.357-365, 2003.

ENTIAUSPE, L. G.; TEIXEIRA, L. O.; MENDONZA-SASSI, R. A.; GONÇALVES, C. V.; GONÇALVES, P.; MARTINEZ, A. M. B. Human papillomavirus: prevalence and genotypes found among HIV-positive and negative women at a reference center in the far south of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, p.260-263, 2010.

EVANDER, M.; EDLUND, K.; BODEN, E.; GUSTAFSSON, A.; JONSSON, M.; KARLSSON, R.; RYLANDER, E.; WADELL, G. Comparison of a One-Step and a Two-Step Polymerase Chain Reaction with Degenerate General Primers in a Population-Based Study of Human Papillomavirus Infection in Young Swedish Women. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p. 987-992, 1992.

FERNANDES, A. P. M.; GONÇALVES, M. A. G.; SIMÕES, R. T.; QUINTANA, S. M.; DUARTE, G.; DONADI, E. A. Influência da infecção pelo HIV-1 sobre a presença do HPV em lesões do colo uterino. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v.16, p.21-25, 2004.

FERNANDES, J. V.; MEISSNER, R. V.; DE CARVALHO, M. G.; FERNANDES, T. A. A. M.; DE AZEVEDO, P. R.; VILLA, L. L. Prevalence of HPV infection by cervical cytologic status in Brazil. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v.105, p.21-24, 2009.

FRANCESCHI, S.; HERRERO, R.; CLIFFORD, G. M.; SNIJDERS, P. J. F.; ARSLAN, A.; ANH, P. T. H.; BOSCH, F. X.; FERRECCIO, C.; HIEU, N. T.; LASCANO-PONCE, E.; MATOS, E.; MOLANO, M.; QIAO, Y. L.; RAJKUMAR, R.; RONCO, G.; DE SANJOSÉ, S.; SHIN, H. R.; SUKVIRACH, S.; THOMAS, J. O.; MEIJER, C. J. L. M.; MUÑOZ, N.; IARC PREVALENCE SURVEYS STUDY GROUP. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. **International Journal of Cancer**, v.119, p.2677-2684, 2006.

FRAZER, I. H. Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: a well evolved relationship. **Virology**, v.384, p.410–414, 2009.

GLOBAL CANCER CONTROL (UICC). Protection against cancer-causing infections. **World Cancer Campaign**, p18-24, 2010.

GOLIJOW, C. D.; ABBA, M. C.; MOURON, S. A.; LAGUENS, R. M.; DULOUT, F. N.; SMITH, J. S. Chlamydia trachomatis and Human papillomavirus infections in cervical disease in Argentine women. **Gynecologic Oncology**, v.96, p.181-186, 2005.

GRAVITT, P. E.; BURK, R. D.; LORINCZ, A.; HERRERO, R.; HILDESHEIM, A.; SHERMAN, M. E.; BRATTI, M. C.; RODRIGUEZ, A. C.; HELZLSOUER, K. J.; SCHIFFMAN, M. A Comparison between Real-Time Polymerase Chain Reaction and Hybrid Capture 2 for Human Papillomavirus DNA Quantitation. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.12, p.477-484, 2003.

GRAVITT, P. E.; PEYTON, C. L.; ALESSI, T. Q.; WHEELER, C. M.; COUTLÉE, F.; HILDESHEIM, A.; SCHIFFMAN, M. H.; SCOTT, D. R.; APPLE, R. J. Improved amplification of genital human papillomaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.357-361, 2000.

HAMID, N. A.; BROWN, C.; GASTON, K. The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.66, p.1700-1717, 2009.

HOWIE, H. L.; KARZENELLENBOGE, R. A.; GALLOWAY, D. A. Papillomavirus E6 proteins. **Virology**, v.384, p.324-334, 2009.

HU, Z.; JIN, G.; WANG, L.; CHEN, F.; WANG, X.; SHEN, H. MDM2 Promoter Polymorphism SNP309 Contributes to Tumor Susceptibility: Evidence from 21 Case-Control Studies. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.16, p.2717-2723, 2007.

HU, X.; ZHANG, Z.; MA, D.; HUETTNER, P. C.; MASSAD, L. S.; NGUYEN, L.; BORECKI, I.; RADER, J. S. TP53, MDM2, NQO1, and susceptibility to cervical cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.19, p.755-761, 2010.

HUDELIST, G.; MANAVI, M.; PISCHINGER, K. I.; WATKINS-RIEDEL, T.; SINGER, C. F.; KUBISTA, E.; CZERWENKA, K. F. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. **Gynecologic Oncology**, v.92, p.873–80, 2004.

HUSNJAK, K.; GRCE, M.; MAGDIC, L.; PAVELIC, K. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. **Journal of Virological Methods**, v.88, p.125-134, 2000.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Human papillomaviruses. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, p.100-B, 2007.

JIANG, P.; LIU, J.; ZENG, X.; LI, W.; TANG, J. Association of TP53 codon 72 polymorphism with cervical cancer risk in Chinese women. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v.197, p.174-178, 2009.

KAPEU, A. S.; LUOSTARINEN, T.; JELLUM, E.; DILLNER, J.; HAKAMA, M.; KOSKELA, P.; LENNER, P.; LOVE, A.; MAHLAMAKI, E.; THORESEN, S.; TRYGGVADOTTIR, L.; WADELL, G.; YOUNGMAN, L.; LEHTINEN, M. Is smoking an independent risk factor for invasive cervical cancer? A nested case-control study within Nordic biobanks. **American Journal of Epidemiology**, v.169, p.480-488, 2009.

KING, C. C.; JAMIESON, D. J.; WIENER, J.; CU-UVIN, S.; KLEIN, R. S.; ROMPALO, A. M.; SHAH, K. V.; SOBEL, J. D. Bacterial vaginosis and the natural history of human papillomavirus. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v.2011, article ID 319460, 8 pages, 2011.

KLUG, S. J.; RESSING, M.; KOENIG, J.; ABBA, M. C.; AGORASTOS, T.; BRENNAN, S. M. F.; CIOTTI, M.; DAS, B. R.; MISTRO, A. D.; DYBIKOWSKA, A. TP53 codon 72 polymorphism and cervical cancer: a pooled analysis of individual data from 49 studies. **The Lancet Oncology**, v.10, p.772-784, 2009.

KRUSE, J. P.; GU, W. Modes of p53 regulation. **Cell**, v.137, p.609-622, 2009.

LANE, D. P.; CRAWFORD, L. V. T antigen is bound to a host protein in SV-40 transformed cells. **Nature**, v. 278, p. 261-263, 1979.

LEVI, J. E. ; FERNANDES, S.; TATENO, A. F.; MOTTA, E.; LIMA, L. P., ELUF-NETO, J. ; PANNUTI, C. S. Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. **Gynecologic Oncology**, v.92, p. 225-31, 2004.

LIN, Y. C.; HUANG, H. I.; WANG, L. H.; TSAI, C. C.; LUNG, O.; DAI, C. Y.; YU, M. L.; HO, C. K.; CHEN, C. H. Polymorphisms of COX-2 -765G>C and p53 codon 72 and risks of oral squamous cell carcinoma in a Taiwan population. **Oral Oncology**, v.44, p.798-804, 2008.

LONGWORTH, M. S.; LAIMINS, L. A. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.68, p.362–372, 2004.

LOUIE, K. S.; DE, S. S.; DIAZ, M.; CASTELLSAGUE, X.; HERRERO, R.; MEIJER, C. J.; SHAH, K.; FRANCESCHI, S.; MUNOZ, N.; BOSCH, F. X. Early age at first sexual intercourse and early pregnancy are risk factors for cervical cancer in developing countries. **Brazilian Journal of Cancer**, v.100, p.1191-1197, 2009.

LUQUE, A. E.; JABEEN, M.; MESSING, S.; LANE, C. A.; DEMETER, L. M.; ROSE, R. C.; REICHMAN, R. C. 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.

MANOS, M. M.; TING, Y.; WRIGHT, D. K.; LEWIS, A. J.; BROKER, T. R.; WOLINSKY, S. M. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses, **Cancer Cells**, v.7, p.209–214, 1989.

MARLOW, L. A.; WALLER, J.; WARDLE, J. Public awareness that HPV is a risk factor for cervical cancer. **Brazilian Journal of Cancer**, v.97, p.691-694, 2007.

MEISSNER, R. V.; BARBOSA, R. N.; FERNANDES, J. V.; GALVÃO, T. M.; GALVÃO, A. F.; OLIVEIRA, G. H. No association between SNP309 promoter polymorphism in the MDM2 and cervical cancer in a study from northeastern Brazil. **Cancer Detection and Prevention**, v.31, p.371-374, 2007.

MENDONÇA, V. G.; GUIMARÃES, M. J. B.; FILHO, J. L. L.; MENDONÇA, C. G.; MARTINS, D. B. G.; CROVELLA, S.; ALENCAR, L. C. A. Infecção cervical por papilomavírus humano: genotipagem viral e fatores de risco para lesão intraepitelial de alto grau e câncer de colo do útero. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.32, p.476-485, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, p. 94, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Portal da Saúde, SUS. Papilomavírus Humano. 2010. Disponível em <http://portal.saude.gov.br>. Acesso em 09 Ago 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL - Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativas 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. p.94, 2011.

MISTRY, N.; WIBOM, C.; EVANDER, M. Cutaneous and mucosal human papillomaviruses differ in net surface charge, potential impact on tropism. **Virology Journal**, v.1, p.118-123, 2008.

MOLIJN, A.; KLETER, B.; QUINT, W.; VAN DOORN, L. J. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections **Journal of Clinical Virology**, v.32S, p.S43–S51, 2005.

MUCHIRI, L.; SEKKADE-KIGONDU, C. B.; NDIRANGU, G.; GICHANGI, P.; MACHOKI, J.; ESTAMBALE, B. B. A.; TEMMERMAN, M. The Impact of Human Immunodeficiency Virus and Human Papillomavirus Co-Infection on HPV Genotype Distribution and Cervical Lesion Grade in a Semi-Urban Population in Tigoni, Kenya. **African Journal of Pharmacology Therapy**, v.1, p.97-105, 2012.

MÜNGER, K.; BALDWIN, A.; EDWARDS, K. M.; HAYAKAWA, H.; NGUYEN, C. L.; OWENS, M.; GRACE, M.; HUH, K. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. **Journal of Virology**, v.78, p.11451–11460, 2004.

MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; DE SANJOSE.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUÉ, X.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J. F.; MEIJER, C. J. L. M. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **National England Journal of Medicine**, v.6, p.518-27, 2003.

MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; DE GONZALÉZ, A. B.; GISSMAN, L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v.24, p.S3/1-S3/10, 2006.

NAM, K. H.; KIM, Y. T.; KIM, S. R.; KIM, S. W.; KIM, J. W.; LEE, M. K.; NAM, E. J.; JUNG, Y. W. Association between bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. **Journal of Gynecologic Oncology**, v.20, p. 39-43, 2009.

NICOL, A. F.; NUOVO, G. J.; SALOMÃO-ESTEVEZ, A.; GRINSZTEIN, B.; TRISTÃO, A.; RUSSOMANO, F.; SILVA, J. R. L.; OLIVEIRA, M. P.; PIRMEZ, C. Immune factors involved in the cervical immune response in the HIV/HPV co-infection. **Journal of Clinical Pathology**, 61(1):84–8, 2008.

NISHIKAWA, A.; FUJIMOTO, T.; AKUTAGAWA, N.; IWASAKI, M.; TAKEUCHI, M.; FUJINAGA, K.; KUDO, R. p53 polymorphism (codon-72) has no correlation with the development and the clinical features of cervical cancer. **International Journal of Gynecological Cancer**, v.10, p.402–407, 2000.

NIWA, Y.; AKAMATSU, H.; NIWA, H.; SUMI, H.; OZAKI, Y.; ABE, A. Correlation of tissue and plasma RANTES levels with disease course in patients with breast or cervical cancer. **Clinical Cancer Research**, v.7, p.285–289, 2001.

NORONHA, V. L.; CRUZ, E. M.; PINHO, C.N.; MELLO, W. A.; VILLA, L. L.; RUSSOMANO, F. B. Human Papillomavirus (HPV) in Women Screened to Cervical Uterine Cancer, Belém – Pará – Brazil. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v.23, p.5-11, 2011.

NUNOBIKI, O.; UEDA, M.; YAMAMATO, M.; TOJI, E.; SATO, N.; IZUMA, S.; OKAMOTO, Y.; TORII, K.; NODA, S. MDM2 SNP 309 human papillomavirus infection in cervical carcinogenesis. **Gynecologic Oncology**, v.118, p.258-261, 2010.

NYAGOL, J.; LEUCCI, E.; ONNIS, A.; DEFALCO, G.; TIGLI, C.; SANSEVERINO, F. The effect of HIV-1 Tat protein on cell cycle during cervical carcinogenesis. **Cancer Biology and Therapy**, v.5, p. 684–690, 2006.

OLIVEIRA-SILVA, M.; LORDELLO, C. X.; ZARDO, L. M. G.; BONVICINO, C. R.; MOREIRA, M. A. M. Human Papillomavirus in Brazilian women with and without cervical lesions. **Virology Journal**, v.8, P.4, 2011.

OLIVIER, M.; HOLLSTEIN, M.; HAINAUT, P. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.2, p.a001008, 2010.

PALEFSKY, J. M.; MINKOFF, H.; KALISH, L. A.; LEVINE, A.; SACKS, H. S.; GARCIA, P.; YOUNG, M.; MELNICK, S.; MIOTTI, P.; BURK, R. Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. **Journal of National Cancer Institute**, v.91, p.226–236, 1999.

PANDITH, A. A.; SHAH, Z. A.; KHAN, N. P.; RASOOL, R.; AFROZE, D.; YOUSUF, A.; WANI, S.; SIDDIQI, M. Role of TP53 Arg72Pro polymorphism in urinary bladder cancer predisposition and predictive impact of proline related genotype in advanced tumors in an ethnic Kashmiri population. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v.203, p.263-268, 2010.

QU, W.; JIANG, G.; CRUZ, Y.; CHANG, C. J.; HO, G. Y. F.; KLEIN, R. S.; BURK, R. D. PCR Detection of Human Papillomavirus: Comparison between MY09/MY11 and GP51/GP61 Primer Systems. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.1304-1310, 1997.

SAUVAGET, S.; NENE, B. M.; KELKAR, R.; MALVI, S. G.; SHASTRI, S.S.; SANKARANARAYANAN, R. Prevalence and determinants of high-risk human

papillomavirus infection in middle-aged indian woman. **Sexually Transmitted Diseases**, v.28, p.902-906, 2011.

SELLORS, J. W.; KARWALAJTYS, T. L.; KACZOROWSKI, J.; MAHONY, J. B.; LYTWYN, A.; CHONG, S.; SPARROW, J.; LORINCZ, A.; THE SURVEY OF HPV IN ONTARIO (SHOW) GROUP. Incidence, clearance and predictors of human papillomavirus infection in women. **Canadian Medical Association Journal**, v.168, p.421-425, 2003.

SIERRA-TORRES, C. H.; TYRING, S.K.; AU, W. W. Risk contribution of sexual behavior and cigarette smoking to cervical neoplasia. **International Journal of Gynecological Cancer**, v.13, p.617-625, 2003.

SILVEIRA, M. F.; SANTOS, I. S. Impact of an educational intervention to promote condom use among the male partners of HIV positive women. **Journal of Evaluation in Clinical Practice**, v.12, p.102-111, 2006.

SNIJDERS, P. J. F.; VAN DEN BRULE, A. J. C.; SCHRIJNEMAKERS, H. F. J.; SNOW, G.; MEIJER, C. J. L. M.; WALBOOMERS, J. M. M. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. **Journal of General Virology**, v.71, p.173-181, 1990.

SOTOMAA, K.; LIYANARACHCHI, S.; MECKLIN, J.; JÄRVINEM, H.; AALTONEN, L. A.; PELTOMÄKI, P.; CHAPPELLE, A. DE LA. P53 Codon 72 and MDM2 SNP309 Polymorphisms and age of colorectal cancer onset in Lynch Syndrome. **Clinical Cancer Research**, v.11, p.6840-6844, 2005.

SOUZA, N. S. T. DE; MELO, V. H. DE; CASTRO, L. F. P. DE. Diagnóstico da infecção pelo HPV em lesões do colo do útero em mulheres HIV+: acuidade da histopatologia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.3, p. 355-361, 2001.

STANLEY, M. A. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. **Gynecologic Oncology**, v.117, p.S5-S10, 2010.

STOREY, A.; THOMAS, M.; KALITA, A.; HARWOOD, C.; GARDIOL, D.; MANTOVANI, F.; BREUER, J.; LEIGH, I. M.; MATLASHEWSKI, G.; BANKS, L. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. **Nature**, v.393, p.229-234, 1998.

TADA, M.; FURUUCHI, K.; KANEDA, M.; MATSUMOTO, J.; TAKAHASHI, M.; HIRAI, A.; MITSUMOTO, Y.; IGGO, R. D.; MORIUCHI, T. Inactivate the remaining p53 allele or the alternate p73? Preferential selection on the Arg72

polymorphism in cancers with recessive p53 mutants but not transdominant mutants. **Carcinogenesis**, v.22, p.515-7, 2001.

THUROW, H. S.; HAACK, R.; HARTWIG, F. P.; OLIVEIRA, I. O.; DELLAGOSTIN, O. A.; GIGANTE, D. P.; HORTA, B. L.; COLLARES, T.; SEIXAS, F. K. TP53 gene polymorphism: importance to cancer, ethnicity and birth weight in a Brazilian cohort. **Journal of Biosciences**, v.36, p.823-831, 2011.

TROFATTER, K. F. Diagnosis of human papillomavirus genital tract infection. **American Journal of Medicine**, v.102, p.21-27, 1997.

TROTTIER, H.; FRANCO, E. L. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. **Vaccine**, v.1, p.S1–S15, 2006.

VAN DOORN, L. J.; KLETER, B.; QUINT, W. G. V. Molecular detection and genotyping of human papillomavirus. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v.4, p.394-402, 2001.

VIGITEL - Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico, Ministério da Saúde do Brasil [database on the Internet]. **Sistema de Monitoramento de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas Não Transmissíveis por meio de Inquérito Telefônico**. c2011 - [cited 2012 Jun 08]. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br>

WANG, S. S.; GONZALEZ, P.; YU, K.; PORRAS, C.; LI, Q.; SAFAEIAN, M.; RODRIGUEZ, A. C.; SHERMAN, M. E.; BRATTI, C.; SCHIFFMAN, M.; WACHOLDER, S.; BURK, S. D.; HERRERO, R.; CHANOCK, S. J.; HILDESHEIM, A. Common Genetic Variants and Risk for HPV Persistence and Progression to Cervical Cancer. **PLOS ONE**, v.5, p.e8667, 2010.

WANRAM, S.; LIMPAIBOON, T.; LEELAYUWAT, C.; YUENYAO, P.; GUINEY, D.G.; LULITANOND, V.; JEARANA KOON, P. The use of viral load as a surrogate marker in predicting disease progression for patients with early invasive cervical cancer with integrated human papillomavirus type 16. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.201, p.79.e1–79.e7, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO/ICO). Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). **Summary report on HPV and cervical cancer statistics in Brazil**, p.28, 2010. Disponível em: www.who.int/hpvcentre

XU, X.; ZHANG, Z.; MA, D.; HUETTNER, P.; MASSAD, S.; NGUYEN, L.; BORECK, I.; RADER, J. S. TP53, MDM2, NQO1 and susceptibility to cervical cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.19, p.755-761, 2010.

YAMASHITA, T.; YAGINUMA, Y.; SAITOH, Y.; KAWAI, K.; KURAKANE, T.; HAYASHI, H.; ISHIKAWA, M. Codon 72 polymorphism of p53 as a risk factor for patients with human papillomavirus-associated squamous intraepithelial lesions and invasive cancer of the uterine cervix. **Carcinogenesis**, v.20, p.1733–1736, 1999.

YE, F.; ZHANG, J.; CHENG, Q.; SHEN, J.; CHEN, H. p53 Codon 72 polymorphism is associated with occurrence of cervical carcinoma in the Chinese population. **Cancer Letters**, v.287, p.117-121, 2010.

ZHENG, Z. M.; BAKER, C. C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. **Frontiers in Biosciences**, v.1, p.2286–2302, 2006.

ZIMMERMMANN, J. B.; MELO, V. H. D. E.; REIS, L. L.; MATOS, L. G. D. E.; COUTO, B. C. S.; ALVES, M. J. M. A multiplicidade do Papilomavírus humano na cérvix uterina de pacientes portadoras do vírus da imunodeficiência humana e sua interação na neoplasia intra-epitelial cervical. **HU Revista**, v.34, p.161-166, 2008.

ZUR HAUSEN, H.; GISSMANN, L.; STEINER, W.; DIPPOLD, W.; DREGER, I. Human papilloma viruses and cancer. **Bibliotheca haematologica**, v.43, p.569-571, 1975.

ZUR HAUSEN, H. Papollomaviruses and Cancer: From basic studies to clinical application. **Nature Reviews**, v. 2, p.342-350, 2002.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. **Virology**, v.384, p.260-265, 2009.

ANEXOS

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Universidade Federal de Pelotas

Faculdade de Medicina- SAE – Centro de Pesquisas Epidemiológicas - Centro
de Pesquisas Tecnológicas
Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E PRÉ-INFORMADO

Investigadores responsáveis: Dr^a Fabiana K. Seixas/ Dr Tiago Collares

Centro de Biotecnologia-UFPEL

Concordo em participar do projeto “*Câncer cervical: genótipos oncogênicos de HPV e polimorfismo do códon 72 do gene p53*”.

PROPÓSITO DE ESTUDO

O propósito desse estudo é estimar o número de pacientes portadores do papilomavírus humano (HPV), seus diferentes genótipos, e presença de polimorfismo da p53 do códon 72, em mulheres atendidas no Ambulatório de Ginecologia e Serviço de Atendimento Especializado (SAE) - Faculdade de Medicina – UFPEL. O HPV é um vírus que pode causar verrugas genitais e, em alguns casos, câncer no útero. Acredita-se que dependendo do alelo encontrado na p53, o risco para câncer cervical possa ser aumentado.

PROCEDIMENTOS

Nós solicitamos que você responda a um questionário dividido em duas etapas. Na primeira etapa, você responderá um questionário sobre trabalho, escolaridade e outras questões gerais. Na segunda, há questões mais pessoais, onde não será colocado o seu nome, para que possamos conhecer algumas informações a seu respeito. Suas respostas são importantes para a realização da pesquisa.

Além disso, nós solicitaremos que seja colhida uma amostra de sangue e de sua secreção uterina para esta pesquisa, quando você for realizar o exame ginecológico de rotina, conhecido por Papanicolaou.

Esta amostra será usada para diagnóstico molecular da infecção, através da detecção do DNA do vírus, para determinar que genótipo do HPV que você está portando, caso esteja infectado e no estudo do gene p53.

A amostra de sua secreção do útero será enviada para o Laboratório de Genômica Funcional, no Centro de Biotecnologia da UFPel e será utilizada apenas para pesquisa. A amostra retirada não será enviada para outros laboratórios e não será usada para propósitos comerciais, sendo descartada no final do estudo.

A coleta da amostra não vai afetar a sua saúde, porém pode você sentir alguma dor discreta, ocasional, pequeno sangramento pós-exame e ardência no momento do exame de inspeção do colo a olho nu, durante o procedimento de coleta de material cervical.

BENEFÍCIOS

Tendo em vista que alguns genótipos do HPV e da p53 podem ou não conferir maior risco ao desenvolvimento de câncer, uma detecção e genotipagem antecipadas desempenham papel importante na definição da terapia e no tratamento a ser utilizado.

ALTERNATIVAS PARA A PARTICIPAÇÃO

Sua participação nesse estudo é voluntária. Caso você não queira participar, continuará a receber o melhor tratamento nesse serviço. Você é livre para retirar o seu consentimento a qualquer hora. Caso você se recuse a participar isso não afetará seu tratamento atual ou futuro, de qualquer forma.

CUSTOS E COMPENSAÇÕES

Você não pagará nada para participar desse estudo. Você não será pago por estar no estudo.

CONFIDENCIALIDADE

Este estudo envolve informações confidenciais. Essas informações serão mantidas estritamente confidenciais. O seu nome não será dado para ninguém além dos profissionais do Laboratório de Genômica Funcional, localizado no Centro de Biotecnologia da UFPel. Qualquer publicação científica dos resultados não identificará você.

PERGUNTAS OU PROBLEMAS

Se você tem alguma pergunta ou problema quanto a esse estudo, contatar Dra. Fabiana Seixas nos tels: (53)32757588 ou (53) 81183711 ou Dr Tiago Collares nos tels: (53)32757588 ou 81183711 ou Dra. Mariângela Silveira no Ambulatório de Ginecologia e Serviço de Atendimento Especializado (SAE) - Faculdade de Medicina – UFPel.

CONSENTIMENTO

Uma vez que você leu (ou lhe foi explicado) e entendeu o propósito desse estudo, os procedimentos que serão realizados, os riscos e benefícios, e você **VOLUNTARIAMENTE** concorda em fazer parte desse estudo, favor assinar seu nome abaixo:

Assinatura: _____

Pelotas, _____ de _____ de 20__.

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE DO INVESTIGADOR: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me à disposição para perguntas e as respondi em sua totalidade. O indivíduo compreendeu minha explicação e aceitou, sem imposições, assinar este consentimento.

ASSINATURA DO INVESTIGADOR: _____

ANEXO B - QUESTIONÁRIO HPV



Questionário nº: _____



Universidade Federal de Pelotas
 Centro de Desenvolvimento Tecnológico
 Laboratório de Genômica Funcional
 Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular
 Centro de Pesquisas Epidemiológicas
 Faculdade de Medicina

QUESTIONÁRIO INDIVIDUAL

MULHERES COM IDADE ENTRE 18 ATÉ 45 ANOS

ATENÇÃO! HIV POSITIVO() HIV NEGATIVO ()

Data da Entrevista: ____ / ____ / ____ Entrevistador: _____ Número do questionário: _____ Número do prontuário: _____ 1. Qual é o seu nome? _____	Datent ____/____/____ Entre ____ Quest ____ Pront ____
A QUESTÃO 2 DEVE SER RESPONDIDA SOMENTE POR MULHERES HIV POSITIVAS:	
2. Há quanto tempo você sabe que tem o HIV? _____ dias ou _____ meses ou _____ anos e _____ meses	HIVtemp ____
3. Qual é a sua data de nascimento? ____ / ____ / ____	
4. Qual a sua idade neste momento? ____ anos	Idade ____

SE A PACIENTE APRESENTAR IDADE MAIOR DE 45 ANOS DE IDADE OU MENOR DE 15 ANOS, AGRADECER E ENCERRAR A ENTREVISTA.	
5. Você está grávida neste momento? () Sim () Não	Gest ____
SE A PACIENTE FOR GESTANTE, AGRADECER E ENCERRAR A ENTREVISTA. SE RESPONDER "NÃO", CONVIDÁ-LA PARA PARTICIPAR DA PESQUISA, LER E DAR PARA ASSINAR O CONSENTIMENTO INFORMADO. SE A PACIENTE FOR ANALFABETA, LER O CONSENTIMENTO E IMPRIMIR A IMPRESSÃO DO POLEGAR DIREITO (LEVAR ALMOFADA DE CARIMBO).	
USE PARA O CONVITE A FALA ABAIXO: <i>"Estamos realizando uma pesquisa sobre a presença do vírus HPV nas mulheres que buscam atendimento aqui na FAMED. Esta pesquisa quer encontrar maneiras de melhorar a sua qualidade de vida e de outras mulheres. Para isto, é muito importante que você participe, respondendo algumas perguntas. Estas perguntas podem parecer embaraçosas às vezes, mas suas respostas vão nos ajudar muito. Você deve saber, que, se não quiser participar, seu tratamento neste serviço continuará sem problemas. No entanto, gostaríamos muito de sua ajuda. Está bem para você?"</i>	
6. Qual o seu endereço atual? (Rua, número, bairro, cidade) Telefone: _____ Como se chega lá?	
7. Que outra pessoa saberia aonde lhe encontrar caso você não esteja em casa ou tenha se mudado? Nome: _____ Relação com a entrevistada: _____ Qual o endereço desta pessoa? (Rua, número, bairro, cidade) Telefone: _____ Como se chega lá?	
8. Que outra pessoa saberia aonde lhe encontrar caso você não esteja em casa ou tenha se mudado? Nome: _____ Relação com a entrevistada: _____ Qual o endereço desta pessoa? (Rua, número, bairro, cidade) Telefone: _____ Como se chega lá?	

A QUESTÃO 9 DEVE SER APENAS OBSERVADA PELO ENTREVISTADOR	
9. Cor: (1) Branca (2) Parda (3) Negra (9) IGN	Cor ____
10. Você sabe ler e escrever ? (1) Sim (2) Não (PULE PARA A PERGUNTA 12) (3) Só assina (PULE PARA A PERGUNTA 12) (9) IGN	Ler ____
11. (SE SIM) Até que série você completou no colégio? ____ Série do ____ grau	Série ____ Grau ____
ATENÇÃO PERGUNTA FILTRO	
12. Você vive com esposo ou companheiro? (1) Sim SE NÃO, É (2) Solteira (3) Viúva (4) Separada/Divorciada (9) IGN	Estciv ____
13. No último mês, desde _____ você trabalhou ou teve outra fonte de renda como benefícios ou aposentadoria? (1) Sim (2) Não (PULE PARA 16) (9) IGN	Renda ____
14. (SE ESTAVA TRABALHANDO, OU É APOSENTADA OU ENCOSTADA) Quanto você ganhou no último mês?(em reais) R\$ _____, ____	Renda1 ____
15. Você mora sozinha? (SE MORA SOZINHA, PULE PARA A PERGUNTA 19) (1) Sim Não (2)	Moraso ____
16. SE NÃO: Na sua casa quantas pessoas moram além de você? _____	Moraju ____
17. Alguma destas pessoas trabalha ou tem alguma fonte de renda como benefícios ou aposentadoria? (1) Sim (2) Não (PULE PARA A PERGUNTA 19) (8) Não se aplica	Outrend ____ ____
18. Quanto ganharam estas pessoas no último mês (em reais)? Pessoa 1 _____ Pessoa 2 _____ Pessoa 3 _____ Pessoa 4 _____ Pessoa 5 _____ Pessoa 6 _____ Pessoa 7 _____ Pessoa 8 _____	Rend1 ____ Rend2 ____ Rend3 ____ Rend4 ____ Rend5 ____ Rend6 ____ Rend7 ____ Rend8 ____

Pessoa 9 _____	Rend9 _____
(8) Não se aplica	
19. Você engravidou alguma vez?	Gesta1 _____
(1) Sim (2) Não (PULE PARA PERGUNTA 27) (9) IGN	
20. SE SIM: Quantas vezes? _____ vezes.	Gesta2 _____
21. Quantos filhos vivos você tem? _____ filhos	Filhovi _____
22. Com que idade teve o primeiro filho? _____ anos	Idafilho _____
23. Você esteve grávida nos últimos 2 anos (isto é desde _____)?	Gesta3 _____
(1) Sim (2) Não (PULE PARA A PERGUNTA 27) (9) IGN	
24. SE SIM, durante a última gestação você fez pré-natal?	Prenat _____
(1) Sim (2) Não (PULE PARA A PERGUNTA 27) (9) IGN	
25. Em que lugar você fez o pré-natal?	
(01) Posto de saúde do bairro	
(02) Outro posto de saúde	
(03) Médico particular	
(04) Ambulatório de hospital pelo SUS (Clínicas, Sta. Casa, Beneficência)	
(05) Ambulatório da Faculdade	
(06) Ambulatório de empresa ligado ao seu trabalho	
(07) Ambulatório de empresa ligado ao trabalho de familiar	
() Outro _____	
(99) IGN	Prenat1 _____
26. Se sim, o médico fez exame ginecológico (examinou sua vagina com bico de pato)	Prenat2 _____
(1) Sim (2) Não (9) IGN	
27. Você pretende engravidar?	Gesta4 _____
(1) Sim (2) Não (9) IGN	
28. Quando você fez o último exame de pré-câncer? _____ anos	
(1) neste ano	
(2) não sabe o que é o exame (PULE PARA A PERGUNTA 30)	
(3) nunca fez (PULE PARA A PERGUNTA 30)	
(4) não lembra	Papanic _____
29. Em que lugar você fez o exame pré-câncer pela última vez?	
(01) Posto de saúde do bairro	
(02) Outro posto de saúde	Papanic1 _____

(03) Médico particular (04) Ambulatório de hospital pelo SUS (Clínicas, Sta. Casa, Beneficência) (05) Ambulatório da Faculdade (06) Ambulatório de empresa ligado ao seu trabalho (07) Ambulatório de empresa ligado ao trabalho de familiar () Outro _____ (99) IGN	
Agora vou lhe fazer algumas perguntas sobre seus hábitos:	
30. Você já fumou ou ainda fuma cigarro? (1) fumante atual (2) ex-fumante (PULE PARA 33) (3) nunca fumou (PULE PARA 36) (9) IGN	Fumo ____
31. SE FUMA: Quantos cigarros por dia você fuma? ____ cig/dia (9) IGN	Cigfuma ____
32. Com que idade começou a fumar? ____ anos (9) IGN (PULE PARA 36)	Idafuma ____
33. SE JÁ FUMOU Há quanto tempo você parou de fumar? ____ (meses) (9) IGN	Parofum ____
34. Quantos cigarros por dia você fumava? ____ (9) IGN	Cigexfumt ____
35. Com que idade começou a fumar? ____ anos (9) IGN	Idexfum ____
36. Durante as últimas 4 semanas quantas vezes você tomou bebidas contendo álcool? (LER) (1) Todos os dias (2) Ao menos uma vez por semana (3) Menos de uma vez por semana (4) Nunca (9) IGN	Alcool ____
37. Você já teve alguma relação em que o parceiro usou preservativo? (1) Sim (PULE PARA A 39) (2) Não	Preserv ____
38. Você já viu um preservativo? (1) Sim (2) Não	Preserv1 ____
39. Que lugares ou pessoas você conhece onde você pode conseguir preservativos? (LER E POR SIM OU NÃO AO LADO DE CADA RESPOSTA CONFORME A RESPONDENTE) (1) Supermercado ou loja de conveniências (1) Sim (2) Não	Preserv2a ____ Preserv2b ____ Preserv2c ____ Preserv2d ____

(2) Farmácia (1) Sim (2) Não (3) Hospital/clínica (1) Sim (2) Não (4) SAE (1) Sim (2) Não (5) Bar/hotel/motel (1) Sim (2) Não () Outro _____ (0) Nenhum	Preserv2e____ Preserv2f____ Preserv2g____
Agora eu gostaria de lhe fazer umas perguntas sobre o HPV:	
40. Eu vou ler algumas frases sobre o HPV. Para cada frase, por favor, diga-me se você acha que é verdade ou não. a) O HPV é um vírus. (1) Verdade (2) Não (9)Não sei b) O HPV é transmitido pelo sexo. (1) Verdade (2) Não (9)Não sei c) O HPV pode causar câncer de colo de útero. (1) Verdade (2) Não (9)Não sei d) O HPV pode causar verrugas genitais. (1) Verdade (2) Não (9)Não sei 41. As pessoas podem proteger-se do HPV: a) permanecendo com um parceiro fiel (1) Verdade (2) Não (9)Não sei b) evitando banheiros públicos (1) Verdade (2) Não (9)Não sei c) usando preservativos durante as relações sexuais (1) Verdade (2) Não (9)Não sei d) evitando tocar uma pessoa que tenha HPV (1) Verdade (2) Não (9)Não sei e) evitando dividir comida com uma pessoa que tem a doença (1) Verdade (2) Não (9)Não sei f) evitando ser mordido por mosquitos ou insetos similares (1) Verdade (2) Não (9)Não sei g) sendo fiel ao seu parceiro (1) Verdade (2) Não (9)Não sei 42. Você acha que uma pessoa que tenha o HPV sempre tem sintomas ou esta pessoa pode parecer perfeitamente saudável? (1) Sempre tem sintomas (2) Pode parecer saudável (3) Não sei 43. Você acha que as pessoas que sabem que tem o HPV devem manter isso em segredo ou devem contar que tem? (LER OPÇÕES) (1) Devem manter em segredo (PULE PARA A 45) (2) Devem revelar para todas as pessoas (PULE PARA A 45) (3) Devem revelar apenas para algumas pessoas (9) Não sei 44. Se apenas para algumas pessoas: Para quem? _____	HPV1a____ HPV1b____ HPV1c____ HPV1d____ HPV2a____ HPV2b____ HPV2c____ HPV2d____ HPV2e____ HPV2f____ HPV2g____ HPV3____ HPV4____ HPV5____
Agora eu gostaria de lhe fazer algumas perguntas sobre a sua vida sexual: <i>"As próximas perguntas são muito íntimas . Responda da forma mais honesta possível. Caso se sinta desconfortável com alguma pergunta (ou com todo o questionário) você</i>	

<i>não é obrigada a responder. É importante que você saiba que suas respostas vão ajudar a desenvolver meios de melhorar a qualidade de vida das mulheres.</i> <i>Também gostaríamos de lhe garantir que suas respostas serão mantidas em segredo.</i> <i>As questões a seguir são sobre o seu comportamento sexual. Quando mencionamos sexo queremos dizer sexo vaginal e anal."</i>		
45. Primeiro gostaria que você pensasse sobre o passado. Você lembra com que idade teve a primeira menstruação? ____ anos		Idamens__ __
46. Quantos anos você tinha quando teve sua primeira relação sexual? Anos_____		Idasex__ __
47. Com quantas pessoas você já manteve relações sexuais durante toda a sua vida? _____		Nucomp__ __
48. Durante os últimos 12 meses, desde _____, algum médico ou outro profissional de saúde lhe disse que você tinha alguma doença transmitida pelo sexo ou DST, como por exemplo, herpes, gonorréia, clamídia, sífilis ou verrugas genitais? (1) Sim (2) Não (PULE PARA A PERGUNTA 52) (9) IGN (PULE PARA A PERGUNTA 52)		DST__
49. Você contou para seu marido/parceiro regular sobre este episódio? (1) Sim (2) Não (3) Não tinha parceiro regular na época (4) Não tinha parceiro (PULE PARA A PERGUNTA 52) (9) IGN		DST1__
50. Enquanto você estava com essa doença você fez alguma coisa para evitar que seu(s) parceiro(s) pegassem esta doença? (1) Sim (2) Não (PULE PARA A PERGUNTA 52) (3) Pegou do parceiro (9) IGN		DST2__
51. SE SIM: O que você fez? APÓS A RESPOSTA ESPONTÂNEA LEIA AS ALTERNATIVAS RESTANTES E MARQUE SIM(1) OU NÃO(2) (1) Usou preservativos (1) Sim (2) Não (3) Sim Espontâneo (2) Evitou relações sexuais (1) Sim (2) Não (3) Sim Espontâneo (3) Deu medicação (1) Sim (2) Não (3) Sim Espontâneo (4) Aconselhou a Ter uma consulta médica (1) Sim (2) Não (3) Sim Espontâneo Outro(especifique) _____		DST3__
52. Durante os últimos 12 meses, desde _____, você deu drogas em troca de sexo, ou recebeu drogas em troca de sexo? Queremos dizer sexo oral, vaginal ou anal. (1) Sim (2) Não (9) IGN		Droga__
53. Durante os últimos 12 meses, desde _____, você deu dinheiro em		Dinheiro__

troca de sexo, ou recebeu dinheiro em troca de sexo? Queremos dizer sexo oral, vaginal ou anal.

(1) Sim (2) Não (9) IGN

AS PERGUNTAS ABAIXO (54 A 70) SÓ DEVEM SER RESPONDIDAS POR AQUELAS MULHERES QUE SE IDENTIFICARAM COMO SENDO CASADAS/COM COMPANHEIRO NA PERGUNTA 12:

54. Durante os últimos 12 meses, **desde** _____, você fez sexo com seu marido/companheiro?

(1) Sim (2) Não **(PULE PARA A PERGUNTA 56)** (9) IGN

Sex__

55. Durante os últimos 12 meses, **desde** _____, quando você fez sexo com seu marido/companheiro, ele usou preservativo? **(LER OPÇÕES)**

(1) Sempre (2) Às vezes (3) Nunca (9)IGN

Preserv3__

56. Você acha que seu marido/companheiro faz sexo com alguém mais além de você?

(1) Sim (2) Não **(PULE PARA A PERGUNTA 58)** (9) IGN

Sex1__

57. Se sim, com quantas pessoas mais além de você? _____

Sex2__

58. Você agora tem um parceiro regular além do seu marido/companheiro? Por parceiro regular eu quero dizer alguém com quem você tem tido sexo por um ano ou mais.

(1) Sim (2) Não **(PULE PARA A PERGUNTA 61)** (9) IGN

Parc__

59. Se sim, quantos destes parceiros regulares você tem? **(NÃO CONTAR MARIDO/COMPANHEIRO)** _____

Parc1__

60. Durante os últimos 12 meses, **desde** _____, quando você fez sexo com seu parceiro regular, ele usou preservativo?**(LER OPÇÕES)**

(1) Sempre (2) Às vezes (3) Nunca (9) IGN (8) Não se aplica

Preserv4__

61. Quando você teve sua última relação sexual com seu marido/parceiro regular?

(1) Nos últimos 7 dias (2) Nas últimas 4 semanas (3) Nos últimos 12 meses (4) Há mais tempo que isto (9) IGN

Parc2__

62. Nessa última relação sexual que você teve, seu marido/companheiro ou parceiro regular usou preservativo?

(1) Sim (2) Não (9) IGN

Preserv5__

63. Você teve relações sexuais com mais alguém nos últimos 12 meses, desde _____? Por mais alguém eu quero dizer outra pessoa além de seu marido ou parceiro regular que você falou antes.

Parc3__

(1) Sim (2) Não (PULE PARA A PERGUNTA 87) (9) IGN	
64. Com quantas pessoas diferentes você teve relações sexuais nos últimos 12 meses (além de seu marido/parceiro regular) Número_____	Parc4__
65. Quando foi que você teve sua última relação sexual com outra pessoa que não seu marido/parceiro regular?	
(1) Nos últimos 7 dias (2) Nas últimas 4 semanas (3) Há mais tempo que isto (9) IGN	Parc5__
66. Nesta última relação sexual que você teve (com alguém que não seu marido/parceiro regular) você deu ou recebeu dinheiro em troca de sexo?	
(1) Sim (2) Não	Dinheiro1__
67. Esta pessoa era alguém que você já conhecia antes ou alguém que você encontrou pela primeira vez?	
(1) Antes (2) Primeira vez	Parc6__
68. Ele usou preservativo nesta última relação sexual?	
(1) Sim (PULE PARA 70) (2) Não (9) IGN	Preserv6__
69. Qual foi a principal razão para que ele não usar preservativo nesta relação?	
UMA RESPOSTA SOMENTE	
(1) Não tinha na hora	
(2) Muito caro	
(3) O parceiro não quis	
(4) Eu não gosto de preservativos	
() outra _____	Preserv7__
70. Onde vocês conseguiram o preservativo que foi usado nesta última relação com alguém que não seu marido/companheiro ou parceiro regular? (PARA QUEM USOU)	
(1) Parceiro (2) Loja (3) Farmácia (4) Hospital/clínica (5) Bar/ hotel/motel	
(6) Outro _____ (8) Não se aplica	Preserv8__
AS PERGUNTAS ABAIXO (71 a 86) SÓ DEVEM SER RESPONDIDAS POR AQUELAS MULHERES QUE SE IDENTIFICARAM COMO SOLTEIRAS/VIÚVAS/SEPARADAS/DIVORCIADAS (PERGUNTA 12)	
71. Você tem um parceiro regular? Por parceiro regular eu quero dizer alguém com quem você tem tido sexo por um ano ou mais.	
(1) Sim (2) Não (PULE PARA A PERGUNTA 79) (9) IGN	Parc7__
72. Se sim, quantos destes parceiros regulares você tem? _____	Parc8__

73. Durante os últimos 12 meses, **desde** _____, você fez sexo com seu parceiro regular?

(1) Sim (2) Não (**PULE PARA A PERGUNTA 79**) (9) IGN

Parc9__

74. Durante os últimos 12 meses, **desde** _____, Quando você fez sexo com seu parceiro regular, ele usou preservativo?(**LER OPÇÕES**)

(1) Sempre (2) Às vezes (3) Nunca (9) IGN

Preserv9__

75. Quando você teve sua última relação sexual com seu parceiro regular?

(1) Nos últimos 7 dias (2) Nas últimas 4 semanas (3) Nos últimos 12 meses (4) Há mais tempo que isto (9) IGN

Parc10__

76. Na última relação sexual que você teve com seu parceiro regular, ele usou preservativo?

(1) Sim (**PULE PARA 78**) (2) Não (9) IGN

Preserv10__

77. Qual foi a principal razão para que ele não usar preservativo nesta relação?

UMA RESPOSTA SOMENTE

(1) Não tinha na hora (2) Muito caro (3) O parceiro não quis

(4) Eu não gosto de preservativos

() outra _____

Preserv11__

78. Onde vocês conseguiram o preservativo que foi usado nesta última relação com seu parceiro regular? (**PARA QUEM USOU**)

(1) Parceiro (2) Loja (3) Farmácia (4) Hospital/clínica (5) SAE (6) Bar/ hotel/motel

(7) Outro _____ (8) Não se aplica

Preserv12__

79. Você teve relações sexuais com alguém que não seja um parceiro regular nos últimos 12 meses, desde _____ ?

(1) Sim (2) Não (**PULE PARA A PERGUNTA 87**) (9) IGN

Parc11__

80. Com quantas pessoas diferentes você teve relações sexuais nos últimos 12 meses (além de seu parceiro regular) Número _____

Parc12__

81. Quando você teve sua última relação sexual (além de seu parceiro regular)

(1) Nos últimos 7 dias (2) Nas últimas 4 semanas (3) Há mais tempo que isto (9) IGN

Parc13__

82. Nesta última relação sexual que você teve com alguém que não é seu parceiro regular você deu ou recebeu dinheiro em troca de Sexo?

(1) Sim (2) Não

Dinheiro2__

83. Esta pessoa era alguém que você já conhecia antes ou alguém que você encontrou

Parc14__

pela primeira vez? (1) Antes (2) Primeira vez	
84. Nesta última relação sexual ele usou preservativo? (1) Sim (PULE PARA 86) (2) Não (9) IGN	Preserv13__
85. Qual foi a principal razão para que você não usasse preservativo nesta relação? UMA RESPOSTA SOMENTE (1) Não tinha na hora (2) Muito caro (3) O parceiro não quis (4) Eu não gosto de preservativos () outra _____	Preserv14__
86. Onde vocês conseguiram o preservativo? (PARA QUEM USOU) (1) Parceiro (2) Loja (3) Farmácia (4) Hospital/clínica (5) Bar/ hotel (6) Outro _____ (8) Não se aplica	Preserv15__

Vamos pensar agora sobre a última vez em que você fez sexo com marido/companheiro Ou com parceiro principal. (RESPOSTA SIM PARA A PERGUNTA 12, 58 OU 71)	
87. Na última vez que você fez sexo com seu parceiro, você fez sexo vaginal, quando o pênis de seu parceiro entra na sua vagina? (1) Sim (2) Não (PULE PARA A PERGUNTA 89) (9) IGN/Recusa	Sexvag__
88. Ele usou preservativo? (1) Sim (2) Não (9) IGN/Recusa	Preserv16__
89. Na última vez que você fez sexo com seu parceiro, você fez sexo oral, quando o pênis de seu parceiro entra na sua boca? (1) Sim (2) Não (PULE PARA A PERGUNTA 91) (9) IGN/Recusa	Sexoral__
90. Ele usou preservativo? (1) Sim (2) Não (9) IGN/Recusa	Preserv17__
91. Na última vez que você fez sexo com seu parceiro, você fez sexo anal, quando o pênis de seu parceiro entra no seu ânus (bunda)? (1) Sim (2) Não (PULE PARA A PERGUNTA 93) (9) IGN/Recusa	Sexanal__

92. Ele usou preservativo? (1) Sim (2) Não (9) IGN/Recusa	Preserv18__
93. Na última vez que você fez sexo com seu parceiro, você fez sexo oral, quando a boca de seu parceiro encosta na sua vagina? 1) Sim (2) Não (PULE PARA A PERGUNTA 95) (9) IGN/Recusa	Sexoral1__
94. Foi usada alguma barreira, como plástico para embrulhar comida, etc.? (1) Sim (2) Não (9) IGN/Recusa	Preserv19__
95. Nos últimos 12 meses você fez sexo com outra mulher? (1) Sim (2) Não (PULE PARA 98 SE HIV POSITIVO OU 100 SE HIV NEGATIVO)	Parc15__
96. Na última vez que você fez sexo com sua parceira, você fez sexo oral, quando a boca de sua parceira encosta na sua vagina? (1) Sim (2) Não (PULE PARA 98 SE HIV POSITIVO OU 100 SE HIV NEGATIVO) (9) IGN/Recusa	Sexoral2__
97. Foi usada alguma barreira, como plástico para embrulhar comida, etc.? (1) Sim (2) Não (9) IGN/Recusa	Preserv20__

ATENÇÃO: AS QUESTÕES 98 E 99 DEVEM SER RESPONDIDAS APENAS POR HIV POSITIVAS (HIV NEGATIVAS PULA PARA 100)	
98. O seu parceiro principal sabe que você é portadora do HIV? (1) Sim (PULE PARA A PERGUNTA 100) (2) Não	HIV__
99. Se não, por quê você não informou ao seu parceiro que você era portadora do HIV? (LER OPÇÕES) (1) Medo de que ele a deixasse (2) Ele também é positivo (PULE PARA 100) (3) Medo de que ele a agredisse (4) Vocês usam preservativo e não havia risco (5) Outro _____ (9) Ignorado	HIV1__
100. O seu parceiro principal era(é) (LER) : (1) HIV positivo (2) HIV negativo (3) Não sabe/Não informou	HIV2__
A PRÓXIMA SÉRIE DE PERGUNTAS É PARA AS MULHERES QUE TIVERAM RELAÇÕES COM PARCEIROS OCASIONAIS NOS ÚLTIMOS 12 MESES (RESPOSTA SIM PARA A PERGUNTA 66 OU 79)	

Vamos pensar agora sobre a última vez em que você fez sexo com alguém que não é ou foi seu parceiro principal

101. Na última vez que você fez Sexo com um parceiro ocasional, você fez sexo vaginal, quando o pênis de seu parceiro entra na sua vagina?

1) Sim (2) Não (**PULE PARA A PERGUNTA 103**) (9) IGN/Recusa

Sexvag1__

102. Ele usou preservativo?

(1) Sim (2) Não (9) IGN/Recusa

Preserv21__

103. Na última vez que você fez Sexo com um parceiro ocasional, você fez Sexo oral, quando o pênis de seu parceiro entra na sua boca?

1) Sim (2) Não (**PULE PARA A PERGUNTA 105**) (9) IGN/Recusa

Sexoral3__

104. Ele usou preservativo?

1) Sim (2) Não (9) IGN/Recusa

Preserv22__

105. Na última vez que você fez sexo com um parceiro ocasional, você fez Sexo anal, quando o pênis de seu parceiro entra no seu ânus (bunda)?

1) Sim (2) Não (**PULE PARA A PERGUNTA 107**) (9) IGN/Recusa

Sexanal1__

106. Ele usou preservativo?

1) Sim (2) Não (9) IGN/Recusa

Preserv23__

107. Na última vez que você fez sexo com um parceiro ocasional, você fez sexo oral, quando a boca de seu parceiro encosta na sua vagina?

1) Sim (2) Não (**PULE PARA A PERGUNTA 109**) (9) IGN/Recusa

Sexoral4__

108. Foi usada alguma barreira, como plástico para embrulhar comida, etc.?

(1) Sim (2) Não (9) IGN/Recusa

Preserv24__

109. Nos últimos 12 meses você fez sexo com outra mulher?

(1) Sim (2) Não (**PULE PARA 112 SE HIV POSITIVO OU 115 SE HIV NEGATIVO**)

Parc16__

110. Na última vez que você fez sexo com sua parceira, você fez sexo oral, quando a boca de sua parceira encosta na sua vagina?

(1) Sim (2) Não (**PULE PARA 112 SE HIV POSITIVO OU 115 SE HIV NEGATIVO**)

(9) IGN/Recusa

Sexoral5__

111. Foi usada alguma barreira, como plástico para embrulhar comida, etc.?

(1) Sim (2) Não (9) IGN/Recusa

Preserv25__

ATENÇÃO: AS QUESTÕES 112 À 114 DEVEM SER RESPONDIDAS APENAS POR HIV POSITIVAS (HIV NEGATIVAS PULA PARA 115)		
112. Na última vez que você teve sexo com um parceiro ocasional você informou a ele que você era portadora do HIV? (1) Sim (PULE PARA A PERGUNTA 114) (2) Não		HIV3__
113. Por quê? (LER OPÇÕES) (1) Medo de que ele a deixasse (2) Ele também é positivo (PULE PARA 115) (3) Medo de que ele a agredisse (4) Vocês usaram preservativo e não havia risco (5) Outro _____ (9) Ignorado		HIV4__
114. O seu parceiro ocasional era (é) (LER) : (1) HIV positivo (2) HIV negativo (3) Não sabe/Não informou		HIV5__
A PRÓXIMA SÉRIE DE PERGUNTAS É PARA SER RESPONDIDA POR TODAS AS MULHERES		
115. No último mês, desde _____ você manteve relações sexuais? (1) Sim (2) Não (PULE PARA 119) (9) IGN		Sex3__
116. No último mês, isto é desde _____, você se lembra com quantas pessoas manteve relações sexuais com: LER OPÇÕES E ANOTAR NÚMERO (1) Marido/companheiro _____ (2) Parceiro regular (relações sexuais por um ano ou mais) Número: _____ (3) Parceiro ocasional (SE SIM: ANOTAR) _____		Sex4__
117. (SE TEVE RELAÇÕES SEXUAIS NO ÚLTIMO MÊS) Você ou seu parceiro usaram algum método para evitar filhos? (ACEITAR MAIS DE UMA RESPOSTA) (00) Não (06) Vasectomia (01) Ligadura de trompas (07) Tabela (02) Pílula (08) Camisinha (03) Coito interrompido (09) Não pode ter filhos (04) DIU (10) Diafragma (05) Gel espermaticida () Outro: _____ (99) IGN		EvitafiA__ EvitafiB__ EvitafiC__ EvitafiD__ EvitafiE__ EvitafiF__ EvitafiG__ EvitafiH__ EvitafiI__ EvitafiJ__ EvitafiL__
118. No último mês, desde _____, quando você fez sexo, seu parceiro usou preservativo? (LER OPÇÕES) (1) Sempre (2) Às vezes (3) Nunca (9) IGN		Preserv26__

119. Nos últimos três meses , desde _____ você manteve relações sexuais? (1) Sim (2) Não (PULE PARA 122) (9) IGN/Recusa	Sex5__
120. Nos últimos três meses, isto é desde _____, você se lembra com quantas pessoas manteve relações sexuais com: LER OPÇÕES E ANOTAR NÚMERO (1) Marido/companheiro _____ (2) Parceiro regular (relações sexuais por um ano ou mais) Número: _____ (3) Parceiro ocasional (SE SIM: ANOTAR) _____	Sex6a__ Sex6b__ Sex6c__
121. Nos últimos três meses, desde _____ quando você fez sexo, o seu parceiro usou preservativo? (LER OPÇÕES) (1) Sempre (2) Às vezes (3) Nunca (9) IGN/Recusa	Preserv27__
122. Na última vez que você teve relações sexuais foi com: LER OPÇÕES (1) Marido/companheiro (2) Parceiro regular (relações sexuais por um ano ou mais) (3) Parceiro ocasional	Sex7a__ Sex7b__ Sex7c__
123. Na última relação sexual que você teve seu parceiro usou preservativo? (1) Sim (2) Não (9) IGN/Recusa	Preserv28__

AGRADEÇA E ENCERRE A ENTREVISTA

► NO MOMENTO DA COLETA:

SINAIS DE CERVICITE
FAZER TESTE DO COTONETE DO CONTEÚDO CERVICAL (COLHER *SWAB*
ENDOCERVICAL COM COTONETE E OBSERVAR SE MUCO PURULENTO
CONTRAPONDO EM PAPEL BRANCO)

124. Mucopus endocervical:

(1) Sim (2) Não

Muco__

125. Colo friável:

(1) Sim (2) Não

Colofac__

126. Dor à mobilização do colo:

(1) Sim (2) Não

Dor__

127. Inspeção do colo

(1) Ác. Acético positivo (2) Ác. Acético negativo

(3) Teste de Schiller positivo (4) Teste de Schiller negativo

Icolo__

COLETA REALIZADA POR: _____

EM: ____ / ____ / 20 ____

REGISTRO DE EXAMES

► GRAM

128. Vaginose (critérios de Nugent)

(1) Sim (2) Não

Vagin__

129. Trichomonas:

(1) Sim (2) Não

Trich__

130. Citopatológico:

- | | |
|------------------|------------------------------------|
| (1) Normal | (7) NIC II |
| (2) Inflamatório | (8) NIC III |
| (3) AGUS | (9) Carcinoma escamosa invasivo |
| (4) ASCUS | (10) Adenocarcinoma <i>in situ</i> |
| (5) HPV | (11) Adenocarcinoma invasivo |
| (6) NIC I | |

Cp__ __

131. Colposcopia:

(1) Normal (2) Anormal

Colp__

132. Se ANORMAL:

(1) Sugestiva de NIC (2) Sugestiva de invasão

ColpAn__

133. Biópsia de colo de útero

(1) sim (2) não

Biop__

134. Resultado biópsia

- | | |
|------------------|------------------------------------|
| (1) Normal | (7) NIC II |
| (2) Inflamatório | (8) NIC III |
| (3) AGUS | (9) Carcinoma escamosa invasivo |
| (4) ASCUS | (10) Adenocarcinoma <i>in situ</i> |
| (5) HPV | (11) Adenocarcinoma invasivo |
| (6) NIC I | |

ResbiopA__

ResbiopB__

ResbiopC__

ResbiopD__

ResbiopE__

135. Tratamento realizado: (SUPERVISOR ANOTAR PASTA) Admite mais de uma opção

Data: __/__/____

Padrão para: (1) Tricomonas (2) Gonorréia (3) Clamídia (4) Nenhum (9) Ignorado

Trat1__

136. Tratamento do parceiro(s) recomendado: Admite mais de uma opção

Data: __/__/____

Padrão para: (1) Sífilis (2) Gonorréia (3) Clamídia (4) Nenhum (9) Ignorado

Trat2__

PACIENTES HIV POSITIVAS:	
137. Carga viral _____ (ANOTAR O ÚLTIMO) em ____/____/____ (DATA)	CV__
138. Células CD4 ⁺ _____ (ANOTAR O ÚLTIMO) em ____/____/____ (DATA)	CD4__
139. Terapia ARV: Drogas: _____ _____	Terap__
140. Tempo de tratamento (meses): ____	Teraptem__

*** LABORATÓRIO DE GENÔMICA FUNCIONAL ***

► STATUS HPV: 141. PCR MY09/11: (1) positivo (2) negativo 142. PCR GP05/06: (1) positivo (2) negativo 143. GENÓTIPO HPV:	PCRMY __ PCRGP __ GenHPV __
► STATUS p53: 144. Genótipo p53 (1) Arg/Arg (2) Arg/Pro (3) Pro/Pro	Genp53 __
► STATUS <i>Chlamydia Trachomatis</i>: 145. PCR CTP1/2: : (1) positivo (2) negativo 146. PCR KIT AMPLICOR: : (1) positivo (2) negativo	PCRCTP1 __ PCRCTKIT __
► STATUS <i>Neisseria gonorrhoeae</i>: 147. PCR KIT AMPLICOR: : (1) positivo (2) negativo	PCRNGKIT __

ANEXO C - LIVRO “RISCO BIOLÓGICO: BOAS PRÁTICAS E BIOSSEGURANÇA

