



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PATRICIA SAYURI SUZUKI

**PAPEL DO *TORQUE TENO VÍRUS* (TTV) E DO
POLIMORFISMO DO GENE CCR5 NO DESENVOLVIMENTO
DO CÂNCER CERVICAL**

Londrina
2008

PATRICIA SAYURI SUZUKI

**PAPEL DO *TORQUE TENO VÍRUS* (TTV) E DO
POLIMORFISMO DO GENE CCR5 NO DESENVOLVIMENTO
DO CÂNCER CERVICAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe

Londrina
2008

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S968p Suzuki, Patrícia Sayuri.
Papel do Torque Teno Vírus (TTV) e do polimorfismo do gene CCR5 no desenvolvimento do câncer cervical / Patrícia Sayuri Suzuki. – Londrina, 2008.
119f. : il.

Orientador: Maria Angelica Ehara Watanabe.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2008.
Inclui bibliografia.

1. Patologia experimental – Teses. 2. Colo uterino – Câncer – Teses. 3. Polimorfismo (Genética) – Teses. 4. TTV (Vírus) – Teses. I. Watanabe, Maria Angelica Ehara. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-092

PATRICIA SAYURI SUZUKI

**PAPEL DO *TORQUE TENO VÍRUS* (TTV) E DO
POLIMORFISMO DO GENE CCR5 NO DESENVOLVIMENTO
DO CÂNCER CERVICAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dra. Jeane Eliete Laguila Visentainer
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Emerson José Venâncio
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 16 de abril de 2008.

Este trabalho foi desenvolvido com apoio financeiro (bolsa de Mestrado) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

*Dedico aos meus pais Joaquim Satoru Suzuki e
Sofia Firoco Suzuki que são exemplos de
dedicação, perseverança, amor e fé.
A eles meu eterno amor e agradecimento.*

*Aos meus irmãos Rogério Yukio Suzuki e Fábio Mineo Suzuki
que sempre estiveram ao meu lado
me incentivando e proporcionando momentos
de muitas alegrias.*

AGRADECIMENTOS

À professora e orientadora Dr^a Maria Angelica Ehara Watanabe, pela calorosa acolhida, pela paciência, pelo exemplo de dedicação e amor à ciência, mas sobretudo, por me mostrar a alegria das descobertas científicas, por acreditar na minha capacidade e pelas constantes palavras de incentivo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental pelo incentivo à pesquisa e apoio Institucional.

Aos Professores Dr. Emerson José Venâncio e Dra. Tânia Longo Mazzuco que aceitaram o convite de fazer parte de minha banca de qualificação e muito contribuíram para a forma final desta dissertação.

À professora Dr^a Halha Ostrensky Saridakis, ao professor Ms Jair Tonon e aos técnicos Pedro Sebastião Raimundo Dionísio Filho e Jesus Antônio Vargas pelo apoio, sem o qual não teria sido possível a realização do sonho de fazer mestrado.

Às minhas amigas Cristina Mitsue Miyauti, Josiane Valadão da Silva e Flávia Midori pelo ombro amigo, pelo apoio constante e pelos belos momentos na faculdade e tardes gastronômicas.

À minha tia, Alice Imamura e sua família que me acolheram com muito carinho e amor, amenizando assim as saudades de casa.

Aos amigos de laboratório Juliana Laino do Val Carneiro, Mateus Nóbrega Aoki, Julie Massayo Maeda Oda, Marla Karine Amarante e Roberto Iemitsu Tatakihara pela paciência, incentivo e por ter tornado esses anos de mestrado tão alegre e inesquecíveis.

À Professora Ms Karen Brajão de Oliveira, pela amizade e pela ajuda na realização dos experimentos e importante auxílio na parte final deste trabalho.

Às Professoras Dr^a Maria Helena P. Fungaro e Dr^a Marcia Cristina Furlanetto, pela amizade, pelos alegres momentos e pela disponibilização dos aparelhos de seus laboratórios.

Aos colegas de mestrado, pelo companheirismo e motivação durante todas as fases e dificuldades encontradas durante este trabalho.

Aos colegas dos laboratórios vizinhos Francine de Paula, Lara Ferracin, Daniele Sartoli, Ligia Uno Lunardi, Carla Beatriz Fier, Fernando Yuldi Ashikaga, Juliana Rota, Marcelo Tempesta, Daniel Favero e Leandro de Barros Ferrari pela alegre convivência e amizade.

Aos funcionários do Setor de Arquivo do Ambulatório do Hospital de clínicas e do Hospital Universitário, em especial à Dulce, pelo auxílio prestado durante a consulta dos prontuários dos pacientes inseridos no estudo.

A todos os pacientes e doadores inseridos no estudo, pois sem eles não seria possível a realização deste trabalho.

Aos professores de mestrado pelo conhecimento transmitido, o qual será de fundamental importância na vida profissional.

À professora Ms Vera Lúcia Hideko Tatakihara pelo auxílio e disposição em esclarecer minhas dúvidas sobre HPV.

A Deus por seu infinito amor, por me agraciar com uma família e amigos ímpares, cujo apoio foi essencial para realização deste trabalho.

"Um pouco de ciência nos afasta de Deus.

Muito, nos aproxima."

Louis Pasteur

"Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso".

Charles Chaplin

SUZUKI, Patrícia Sayuri. **Papel do *Torque Teno Vírus* (TTV) e do polimorfismo do gene CCR5 no desenvolvimento do câncer cervical**. 2008. 108f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

Papilomavirus humano (HPV) de alto risco é um fator necessário para o desenvolvimento de câncer cervical uterino. Contudo, somente uma pequena proporção de mulheres infectadas pelo HPV desenvolverá câncer cervical; muitos outros co-fatores podem aumentar a persistência da infecção e sua oncogênese. O *Torque Teno Vírus* (TTV) e o polimorfismo do gene para o receptor de quimiocina 5 podem agir como co-fatores para carcinogênese cervical. TTV é um vírus não-envelopado, circular, DNA fita simples e seu papel patogênico ainda não foi elucidado. Este trabalho teve como objetivo investigar a relação do TTV em pacientes coinfetados com HPV no desenvolvimento do câncer cervical uterino. A presença do TTV foi investigada no sangue periférico de 117 indivíduos, por PCR *nested* utilizando um conjunto de oligos iniciadores para a região N22 da ORF-1 e para a análise do polimorfismo do gene CCR5 foram utilizados oligos iniciadores sintetizados de acordo com a seqüência no *GenBank* AF009962. A presença do DNA do TTV foi observada em 18,6% (08/43) dos pacientes negativos para HPV, e em 24,32% (18/74) dos pacientes sugestivos para infecção por HPV. O TTV também foi investigado em pacientes sugestivos para infecção por HPV sem câncer e com câncer. O DNA do TTV foi significativamente mais prevalente em pacientes sugestivos para HPV com câncer 57,14% (8/14) do que nos pacientes sugestivos para HPV sem câncer (16,67%) (10/60). O genótipo selvagem para o polimorfismo do gene CCR5 foi igualmente prevalente nos pacientes HPV negativo (38/43) e naqueles pacientes com colpocitologia oncótica sugestiva para infecção por HPV (70/74). Foi verificado neste trabalho, que a presença da infecção por TTV pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de câncer em pacientes co-infetados por HPV-TTV, e o polimorfismo do CCR5 não apresenta associação com o câncer cervical. Contudo, mais estudos são necessários para elucidar o papel do TTV no desenvolvimento de câncer cervical relacionado ao HPV.

Palavras-chave: DNA TTV. HPV. CCR5. Câncer cervical uterino.

SUZUKI, Patricia Sayuri. **Role of *Torque Teno Virus (TTV)* and polymorphism of *CCR5* gene in the cervical cancer development.** 2008. 108f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

High-risk human papillomaviruses (HPVs) are a required factor for cervical uterine cancer development. However, only a small proportion of HPV-infected women will develop cervical cancer; several other cofactors may enhance persistent infection and oncogenesis. Torque Teno Virus (TTV) and genetic polymorphism for chemokine receptor 5 may act as cofactor for cervical carcinogenesis. TTV is an unenveloped, circular, single-strand DNA and its pathological role remains unclear. The aim of this work was to investigate the association of TTV in patients coinfecting with HPV in the cervical cancer development. The presence of TTV was investigated in the peripheral blood of 117 Brazilian women by nested PCR, using a set of primers for the N22 region of the large ORF-1 and the analyze CCR5 polymorphism was using primers with GenBank accession AF009962. TTV DNA presence was observed in 18.6% (08/43) of HPV negative individuals and in 24.32% (18/74) HPV suggestive patients. TTV presence was also investigated in the HPV suggestive patient group, for comparison of cancer and noncancer patients. TTV DNA was significantly more prevalent among HPV suggestive patients presenting cancer (57.14%; 08/14) compared to HPV suggestive noncancer patients (both 16.67%; 10/60). The wild type polymorphism of CCR5 gene was prevalent both in the HPV negative (38/43) and patients with oncotic colposcopy suggestive for HPV (70/74). In this work, was verified that the presence of TTV infection could be a risk factor for cancer development in patients with co-infection for HPV-TTV, and there was no association with CCR5 polymorphism. However, further studies are required to clarify the influence of TTV in the cervical cancer development.

Keywords: TTV DNA. HPV. CCR5. Cervical cancer.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1 – Vírus HPV próximo a uma célula epitelial	17
Figura 2 – Distribuição mundial do HPV16 e HPV18	18
Figura 3 – Prevalência da infecção por HPV, lesões pré-cancerosas e câncer cervical pela idade da mulher	19
Figura 4 – Papanicolaou – Células escamosas maduras.....	20
Figura 5 – Organização Genômica do TTV	24
Figura 6 – Receptor de Quimiocina 5 (CCR5).....	30

Resultados

Figura 1 – Faixa etária dos pacientes	41
Figura 2 – Distribuição mundial do HPV16 e HPV18 em mulheres com citologia normal e mulheres com carcinoma cervical invasivo	42
Figura 3 – Faixa etária dos pacientes sugestivo para HPV e com câncer	42
Figura 4 – Detecção de <i>Gardnerella vaginalis</i> e <i>Trichomonas vaginalis</i> em pacientes sugestivos para HPV e com câncer	43
Figura 5 – Detecção do TT vírus por através da PCR.....	44
Figura 6 – Detecção do TTV em pacientes HPV negativos e pacientes sugestivos para infecção por HPV	45
Figura 7 – Seqüenciamento automático do produto de clonagem do TTV	45
Figura 8 – Detecção do TTV em pacientes sugestivos para HPV sem câncer e com câncer.	46
Figura 9 – Análise genotípica do receptor de quimiocina 5 em pacientes HPV negativo	48
Figura 10 – Relação do polimorfismo do gene CCR5 com TTV.....	48
Figura 11 – Relação do polimorfismo do gene CCR5 com TTV em pacientes sugestivos para HPV	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frequência alélica e genotípica para os alelos $\Delta 32$ e wt do CCR5	47
Tabela 2 – Relação do polimorfismo do gene CCR5 com HPV e TTV	47
Tabela 3 – Relação do polimorfismo do gene CCR5 com TTV em pacientes sugestivos para HPV sem câncer e com câncer	48

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALT	Alanina Aminotransferase
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
ATPase	Adenosina Trifosfatase
CCL4	Ligante do CCR4
CCL5	Ligante do CCR5
CCR3	Receptor de quimiocina 3
CCR5	Receptor de quimiocina 5
CCR5/Δ32	Gene CCR5 com deleção de 32 pares de bases
CIN	Neoplasia Intraepitelial Cervical
CMBKR5	Locus gênico localizado no cromossomo 3
CMI	Imunidade Mediada por Células
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CsCl	Cloreto de céσιο
CXC	Quimiocina da família CXC
CXCR1	Receptor de quimiocina 1
CXCR2	Receptor de quimiocina 2
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DO	Densidade Óptica
EDTA	Ácido Dietilenoaminotetraacetato Dissódico
HIV	Vírus da Imunodeficia Humana
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HPV	Papilomavírus Humano
HSIL	Lesão Intraepitelial de Alto Grau
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IL-8	Interleucina 8
INCA	Instituto Nacional de Câncer
JEC	Junção Escamo-Colunar
LC	Células de Langerhans
LSIL	Lesão Intraepitelial de Baixo Grau

MCP-3	Proteína quimiotática de monócitos -3
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
MIP-α e β	Proteína Inflamatória de Macrófago alfa e beta
NCBI	Centro Nacional de informação Biotecnológica
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
ORF	Sequência de leitura aberta
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RANTES	Regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais
S100	Proteína ligante de cálcio
SDF-1	Fator Derivado do Estroma da Medula Óssea 1
SDS	Duodecil Sulfato de Sódio
Th1	Linfócito T auxiliar CD4 ⁺ 1
TTV	<i>Torque Teno Virus</i>
TZ	Zona de Transformação
UTR	Região não codificadora
WHO	Organização mundial da saúde
Δ32/Δ32	Gene CCR5 com deleção de 32 pares de bases homozigoto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 CÂNCER CERVICAL	16
1.2 GENÓTIPO E DISTRIBUIÇÃO DO HPV	17
1.3 IMUNOLOGIA DA INFECÇÃO	21
1.4 TORQUE TENO VIRUS	23
1.4.1 Aspectos gerais	23
1.4.2 Aspectos moleculares	23
1.4.3 Aspectos patológicos	25
1.4.4 Aspectos imunológicos	26
1.5 QUIMIOCINAS	27
1.5.1 Receptores de quimiocinas	28
1.5.2 Receptores de quimiocina 5	29
2 JUSTIFICATIVA	32
3 OBJETIVOS	33
3.1 OBJETICO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 POPULAÇÃO ESTUDADA	34
4.2 ANÁLISE CITOLÓGICA	34
4.3 ANÁLISE MOLECULAR	35
4.3.1 Obtenção do DNA	35
4.3.2 Detecção qualitativa do TTV	35
4.3.2.1 Clonagem	36
4.3.2.1.1 Purificação das amostras	36
4.3.2.1.2 Preparação de células competentes	37
4.3.2.1.3 Reação de ligação	37
4.3.2.1.4 Transformação	38
4.3.2.1.5 Extração do DNA plasmidial (Mini-Prep)	39
4.3.2.2 Seqüenciamento	39

4.3.3 Análise do polimorfismo do gene CCR5 pela reação em cadeia da polimerase (PCR).	40
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
5 RESULTADOS	41
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55
ANEXOS	68
Anexo I	69
Anexo II.....	70
Anexo III	72
Anexo IV	73
Anexo V.....	87
Anexo VI	97

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER CERVICAL

Câncer cervical é uma denominação habitualmente utilizada para designar o câncer da cérvix uterina, sendo este tipo o que mais afeta as mulheres nos países em desenvolvimento. É estimado que esta patologia foi responsável por quase 260.000 mortes em 2005, as quais 80% ocorreram em países em desenvolvimento (WHO, 2007).

O trato genital inferior feminino compreende quatro regiões anatômicas: o intróito, o qual está recoberto por um epitélio escamoso estratificado queratinizado parecido com a pele; a mucosa vaginal, a qual é recoberta por um epitélio escamoso estratificado não-queratinizado, aglandular; a ectocérvix, a qual é recoberta por uma mucosa histologicamente similar à da vagina; a endocérvix, que consiste num epitélio colunar com numerosas glândulas (pseudo-glândulas) (Pudney *et al*, 2005).

A zona de transformação (TZ) ou junção escamo-colunar (JEC) representa uma transição entre a ectocérvix e endocérvix, sendo o principal local de infecção pelo papilomavírus humano (HPV) (Pudney *et al*, 2005). É estimado que o HPV cause aproximadamente meio milhão de novos cânceres a cada ano (WHO, 2007).

O HPV é um vírus DNA dupla-fita circular, com aproximadamente 8000 pares de bases contidos num capsídeo icosaédrico de aproximadamente 55nm de diâmetro (Munger *et al.*, 2004; Sinal & Woods, 2005) e infecta as células da pele ou mucosa (de Villiers, 1997) (Figura 1).

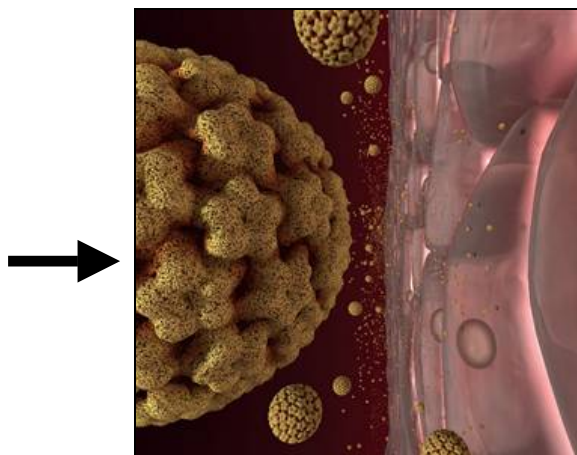
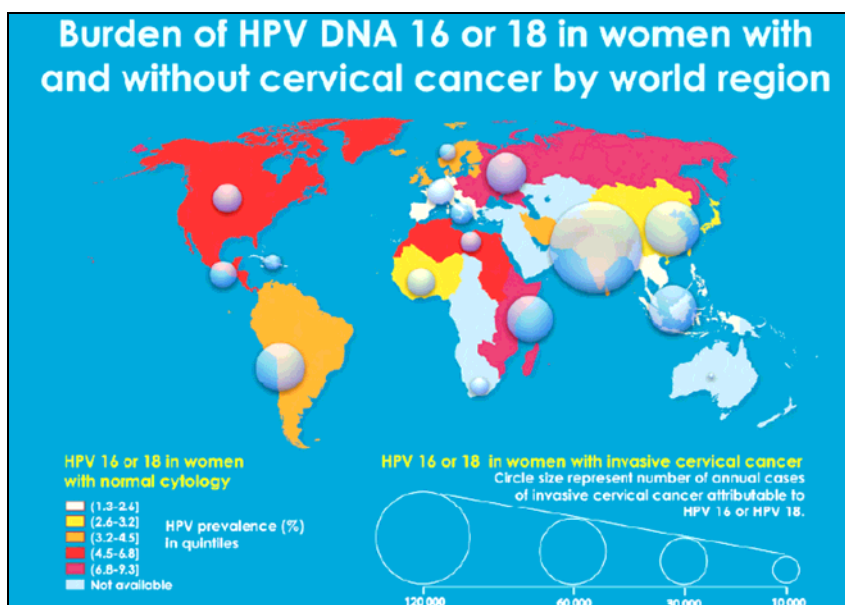


Figura 1 – Vírus HPV (seta) próximo a uma célula epitelial. Microfotografia computadorizada demonstrando o HPV próximo a célula. Fonte. NEWSWEEK *health for life*. <http://www.msnbc.msn.com/id/12333785/site/newsweek/page/0/>

1.2 GENÓTIPO E DISTRIBUIÇÃO DO HPV

O HPV apresenta mais de 100 genótipos, os quais foram numerados de acordo com a ordem de descoberta (de Villiers, 1997). Os HPVs são geralmente agrupados de acordo com sua associação com câncer cervical ou lesões pré-cancerosas e sua seqüência genômica: HPV com alto risco de câncer (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82), tipos de alto risco de prováveis causadores de câncer (26, 53 e 66) e tipos de baixo risco de câncer (6, 11, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e 89). HPVs de baixo risco são encontrados principalmente em verrugas genitais, enquanto HPVs de alto risco são encontrados em câncer cervical e lesões pré-cancerosas (Munoz *et al*, 2003).

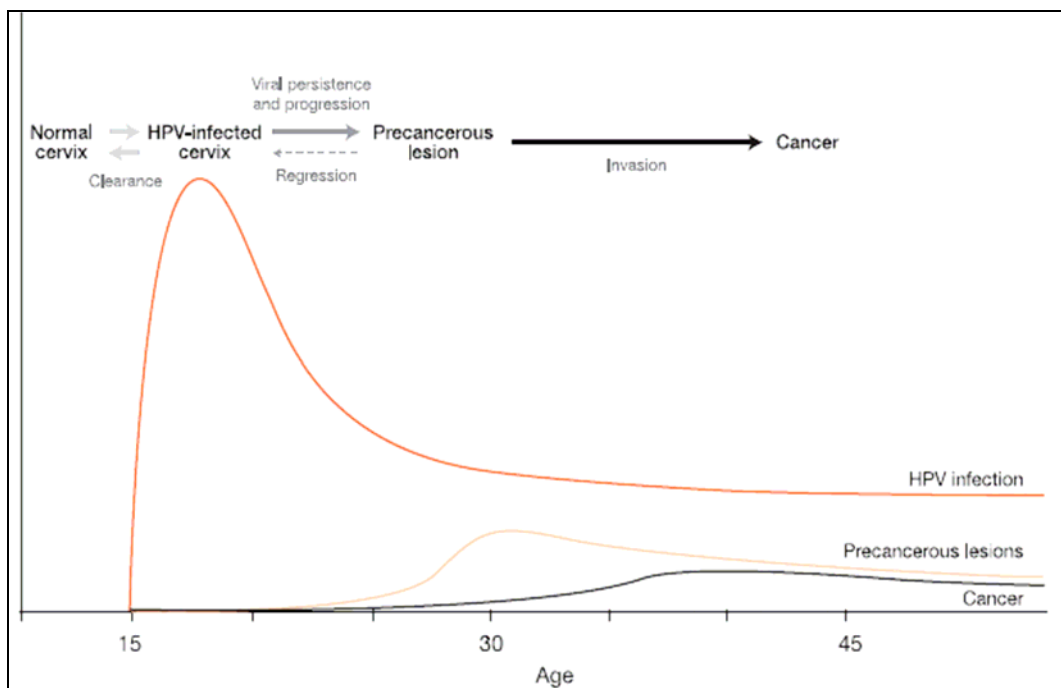
HPV16 e HPV18 são dois tipos de HPV altamente carcinogênicos, sendo responsáveis por 70% do câncer cervical e, aproximadamente, 50% da neoplasia intraepitelial cervical (NIC III) (Smith *et al.*, 2007); em contraste, HPV 6 e HPV 11 são responsáveis por, aproximadamente, 90% das verrugas genitais (Schiffman *et al.*, 2007). A distribuição geográfica do HPV de alto risco está mostrada na figura 2.



Fonte: WHO 2007. http://www.who.int/hpvcentre/statistics/statistics_map_ICO.pdf

Figura 2 – Distribuição mundial do HPV16 e HPV18 em mulheres com citologia normal e mulheres com carcinoma cervical invasivo. Segundo a Organização Mundial da Saúde em relação à distribuição geográfica, a maior incidência de câncer cervical ocorre em países em desenvolvimento.

A maior prevalência de HPV é observada em mulheres sexualmente ativas menores de 25 anos de idade. O HPV genital é encontrado em aproximadamente 10-40% dessas mulheres. A maioria dessas infecções parece ser auto-limitada e não está associada com alterações citológicas detectáveis pela triagem do Papanicolaou. Uma minoria de mulheres HPV-positivo desenvolvem alterações citológicas de baixo grau (Becker *et al*, 1991; de Villiers *et al*, 1992; Schiffman, M.H., 1992). A maior incidência de lesões de alto grau é em mulheres com mais de 25 anos de idade, enquanto que a maior incidência de câncer cervical é em mulheres com mais de 35 anos (Schiffman, M.H., 1992). Estes achados sugerem que HPV de alto risco, normalmente, produz uma infecção inaparente transitória na área cérvico-vaginal. Algumas mulheres desenvolvem uma infecção persistente nesse tecido, talvez como resultado de um mecanismo de defesa deficiente. Lesões persistentes podem progredir para câncer cervical nessas mulheres (Lowy *et al*, 1994) (Figura 3).



Fonte: WHO 2005

<http://www.who.int/reproductive-health/publications/hpvpvaccines/text.pdf>

Figura 3 – Prevalência da infecção por HPV, lesões pré-cancerosas e câncer cervical pela idade da mulher. Maior incidência de lesões pré-cancerosas em mulheres acima de 25 anos e maior prevalência de câncer cervical em mulheres acima de 35 anos de idade.

O rastreamento com o esfregaço de Papanicolaou é muito eficaz na prevenção do câncer cervical porque a maioria dos cânceres é precedida por uma lesão pré-cancerosa. Essa lesão pré-cancerosa pode permanecer em um estágio não invasivo durante um período muito longo de tempo (por exemplo, 20 anos) e desprender células anormais que podem ser detectadas pelo exame citológico (Robbins & Cotran, 2007), no qual podemos observar a presença de coilócitos, os quais são células atípicas com uma cavitação ou auréola perinuclear no citoplasma (Richart, 1990) e constituem um sinal patognomônico de infecção por HPV (Figura 4).



Fonte: Centro Integrado de Colposcopia e Citopatologia.
<http://www.cicc.com.br/miniatlas.asp>

Figura 4 – Células escamosas maduras. O coilócito (seta), patognomônico de infecção por HPV visualizado pelo método de Papanicolaou. Aumento 400x.

Quanto à análise das lesões por esfregaço, o sistema neoplasia intraepitelial cervical (NIC) foi introduzido em 1973 e é baseado na arquitetura tecidual (Richart, 1973). NIC I refere-se às células anormais ocupando 1/3 da região mais superficial do estrato epitelial cervical, NIC II indica que 2/3 do epitélio está sendo ocupado e NIC III indica que toda camada epitelial está ocupada. NIC I, NIC II e NIC III descrevem diferentes processos – NIC I indica uma infecção por HPV auto-limitada, e NIC II ou NIC III são efetivos precursores de câncer cervical (Kiviat & Koutsky, 1993). Em 1988 foi introduzido outro sistema de classificação, o Sistema Bethesda que classifica as anormalidades citológicas em: lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL) ou lesão intraepitelial de alto-grau (HSIL) (Solomon *et al*, 2002). LSIL corresponde ao NIC I e infecção por HPV; e HSIL corresponde ao NIC II, NIC III e carcinoma *in situ*.

Existem dois tipos principais de câncer cervical: carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma. Aproximadamente, 80% dos cânceres cervicais são carcinoma de células escamosas, enquanto os 20% restantes são adenocarcinomas e câncer cervical de outras origens (DiSaia, 1997).

1.3 IMUNOLOGIA DA INFECÇÃO POR HPV

Estudos recentes têm demonstrado haver um microambiente imunológico no trato genital feminino, e a resposta imune é afetada por hormônios bem como infecções e processos inflamatórios (Pudney *et al.*, 2005).

A imunidade humoral no trato genital feminino é mediada pela ação das imunoglobulinas IgA e IgG secretadas em abundância na lâmina própria da endocérvice e em escassez na vagina (Cohen & Anderson, 1999). Entretanto, ao contrário da resposta humoral do pulmão e intestino, há um predomínio de IgG ao invés da IgA no trato genital (Johansson & Lycke, 2003).

Tem sido documentado que outros mecanismos participam na resposta imune humoral, tais como produção de moléculas antimicrobianas como lisozimas, lactoferrinas, inibidor da serina leucócito protease, alfa- e beta-defensinas todas essas moléculas são produzidas pelo epitélio celular e outros locais no trato genital feminino (Johansson & Lycke, 2003).

A imunidade mediada por células (IMC) no trato genital feminino (em mulheres sem inflamação) é mediada por células T (predominantemente células T CD8+) e células apresentadoras de antígenos (CPA), aos quais estão prevalentemente localizadas na zona de transformação e ectocérvice. Em contraste, na mucosa vaginal normal há poucas células T e APCs (Pudney *et al.*, 2005).

Estudos epidemiológicos têm revelado que mulheres HPV soropositivas apresentam alto risco para neoplasias cervicais (De Sanjose *et al.*, 1996; Lehtinen *et al.*, 1996). Anticorpos para HPV são marcadores para exposição a essa infecção (De Sanjose *et al.*, 1996), sendo que produção de anticorpos é importante na prevenção da transmissão e reinfecção do HPV. Muitos anticorpos são tipo específicos e aparecem de seis meses a um ano após a infecção pelo HPV, sendo que a IgG está associada com a persistência da infecção pelo HPV (Burd, 2003).

A eficácia do sistema imune mediado por células depende da identificação do antígeno e sua apresentação a uma população de linfócitos apropriados. As células de Langerhans (LC) são as principais células apresentadoras de antígenos responsáveis pela resposta imune cutânea e das mucosas no baixo trato genital feminino. Elas são células dendríticas especializadas, e expressam moléculas como CD1a (T6), adenosina-trifosfatase

(ATPase), complexo de histocompatibilidade principal (MHC), moléculas coestimulatórias, S100 uma proteína ligante de cálcio envolvida na regulação de uma série de processos celulares, incluindo sinalização imune, entre outras (Tay *et al.*, 1987a ; Klingman & Hilt, 1998; Schafer & Heizmann, 1996).

A infecção pelo HPV parece depletar seletivamente a subpopulação de LCs S100+ ou alterar a expressão de S100, levando a um defeito na habilidade de sinalização das LCs Taube *et al.*, (2007). Tay *et al.* (1987b) demonstraram uma redução de 60% do CD1a (T6), ATPase, MHC II em pacientes com HPV e neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e uma quase completa ausência de LC S100. Connor *et al.* (1999) observaram uma similar redução de LC S100+ em lesões intraepiteliais cervicais.

Outro mecanismo pelo qual o HPV evade do sistema imune mediado por células é pela diminuição da expressão de antígeno leucocitário humano (HLA). Constitutivamente, LCs expressam moléculas de MHC II, contudo, a infecção por HPV 16 e HPV 18 leva a uma diminuição na expressão dessas moléculas no epitélio cervical (Gonçalves *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de câncer cervical está fortemente associado com infecção genital de tipos oncogênicos de papilomavirus humano. Como a maioria das mulheres infectadas por HPV nunca desenvolveu câncer, parecem ser necessários fatores adicionais. A relativa importância de fatores genéticos e ambientais no desenvolvimento do tumor cervical ainda é desconhecida (Zheng *et al.*, 2006). Um dos possíveis fatores pode estar relacionado à infecção conjunta com outros vírus, como foi reportado por Szládek *et al.* (2005), os quais sugeriram que a coinfeção do *TORQUE TENO VIRUS* (TTV) genogrupo 1 e HPV, promoveriam a progressão do carcinoma de células escamosas da laringe e estaria associada com um prognóstico desfavorável; além disso, Figueiredo *et al.* (2007) relataram um possível envolvimento do TTV na patogênese do Linfoma de Hodgkin em adultos jovens. No entanto, não há relatos sobre o papel do TTV na patogênese do câncer cervical promovido por HPV oncogênico.

1.4 TORQUE TENO VIRUS

1.4.1 Aspectos Gerais

O *Torque Teno Vírus* (TTV) foi inicialmente identificado por Nishizawa *et al.* em 1997, em pacientes com elevados níveis de alanina aminotransferase (ALT), porém negativos para hepatites de A a G. Esse vírus tem seu nome associado às iniciais do primeiro paciente investigado pelo grupo de Nishizawa (paciente TT), contudo essas iniciais também podem designar *transfusion-transmitted vírus* (Bendinelli *et al.*, 2001; Nishizawa *et al.*, 1997) ou ainda, como foi recentemente proposto por taxonomistas, *Torque Teno Vírus* (Abraham, 2005).

O papel patogênico do TTV ainda permanece sob discussão, uma vez que, inicialmente, pensava-se ser patogênico para o fígado, o que sugeriria uma falência hepática fulminante (Nishizawa *et al.* 1997). Porém, não há manifestações clínicas exclusivas associadas ao TTV e ainda a infecção ativa por TTV é altamente prevalente entre indivíduos aparentemente saudáveis. Por isso, acredita-se que o TTV é essencialmente desprovido de potencial patogênico. Estudos estão sendo realizados com o genótipo 1 do TTV, pela possibilidade de induzir doença no ser humano, além de sua prevalência e distribuição mundial (Bendinelli *et al.*, 2001).

1.4.2 Aspectos Moleculares

O TTV é um vírus não envelopado cujo genoma consiste em uma molécula circular de DNA fita simples, com polaridade negativa e um comprimento de aproximadamente 3,8 kb (Mushahwar *et al.*, 1999). Inicialmente, foi proposto um genoma viral linear, mas após a análise realizada por seqüenciamento foram evidenciadas duas extremidades conectadas por uma região rica em G+C de aproximadamente 100 nucleotídeos, formando uma molécula circular covalentemente fechada (Okamoto *et al.*, 1998a).

O TTV tem uma densidade de 1,31-1,34 g/mL em CsCl (Mushahwar *et al.*, 1999; Miyata *et al.*, 1999). O genoma do TTV tem duas ou três possíveis Regiões de leitura

aberta (*Open Reading Frame*) (ORFs) capazes de codificar proteínas de 770 aa (ORF1), 202 aa (ORF2) e 105 aa (ORF3) (Figura 5) (Miyata *et al.*, 1999).

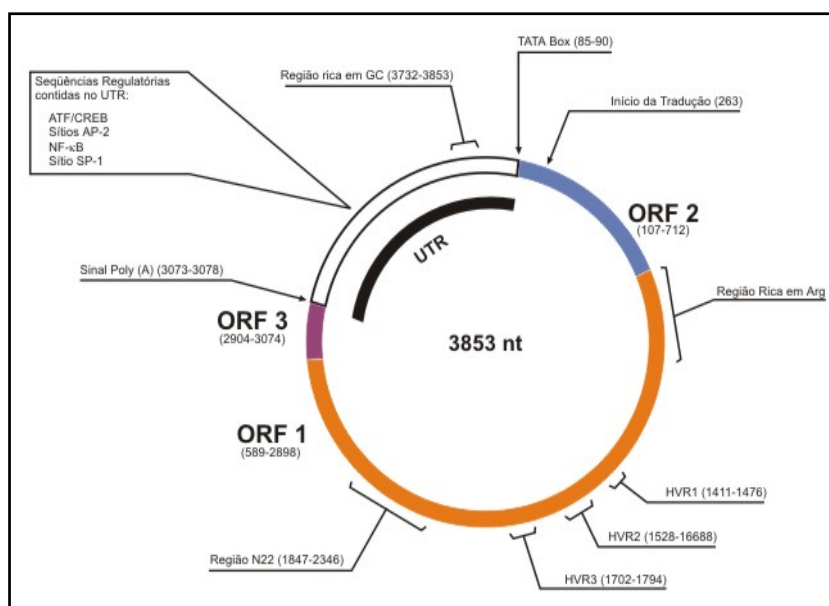


Figura 5 – Organização genômica do TTV mostrando o DNA circular, simples-fita de polaridade negativa encapsulado dentro do vírion. Posições nucleotídicas do isolado TA278. O esquema mostra as ORFs 1, 2 e 3, a região UTR, bem como outras regiões importantes como a região N22, muito utilizada para estudos epidemiológicos e genotipagem (Bendinelli *et al.*, 2001).

Muitos estudos indicaram um grau elevado de diversidade genética para o TTV. O genoma inteiro foi seqüenciado para os isolados de SANBAN e de TA 278 (Hijikata *et al.*, 1999), os quais representam duas variantes genotípicas. A organização genética do genoma era similar em dois isolados: duas regiões de leitura aberta (ORF1 e ORF2) foram alinhadas pelos domínios TATA Box, sinal de poliadenilação e por um segmento curto, rico em GC que se localizam no meio da região não traduzida. A identidade total da seqüência de nucleotídeos entre os dois isolados eram 56.7%, significativamente abaixo da encontrada entre TA278 e GH1 (93%) (Mushahwar *et al.*, 1999).

Inicialmente, acreditava-se que o TTV fosse semelhante aos parvovírus (Okamoto *et al.*, 1998b; Miyata *et al.*, 1999), mas estruturas biofísicas e moleculares observadas por Hijikata *et al.* (1999), levaram Bendinelli *et al.*, (2001) a enfatizar sua semelhança com os circovírus que, conforme Todd *et al.* (1990) possuem genomas circulares não-segmentados com capsídeos isométricos possuindo uma simples proteína estrutural viral, com ausência de lipídeos e carboidratos.

Os TTVs apresentam um grande grau de divergência na seqüência genômica (Khudyakowv *et al.*, 2000; Mushahwar I.K., 2000; Okamoto *et al.*, 1999) e essa expressiva divergência reflete na identificação em mais de 30 genótipos, a maioria dos quais foram identificados com base no estudo filogenético da região N22, localizada na ORF-1. Esses genótipos são classificados em 5 grupos: grupo 1 composto pelos genótipos 1-6; grupo 2 dos genótipos 7,8,17,22 e 23; grupo 3 de 11 genótipos (9-16 e 18-20); grupo 4 de nove genótipos, e grupo 5 de três genótipos (Peng *et al.*, 2002).

1.4.3 Aspectos Patológicos

O papel patogênico do TTV ainda é pouco discutido. TTV originalmente foi demonstrado como sendo um vírus patogênico para o fígado, sugerindo ser o causador da falência hepática fulminante (Nishizawa *et al.*, 1997). Posteriormente, Kato *et al.*, (2000), em seus estudos clínicos, concluíram que níveis séricos de TTV não afetam a lesão hepática.

O TTV pode causar uma infecção transitória ou persistente. No Brasil, nos estados de São Paulo e Pará, o TTV foi encontrado em pacientes com hepatopatias crônicas (Takahashi *et al.*, 2000), e no Japão, foi encontrado em 47% de casos de hepatites fulminantes e crônicas não A-G, em 38% de casos de cirrose de etiologia não conhecida e 12% de doadores de sangue (Kato *et al.*, 1998; Okamoto *et al.*, 1998a; Simmonds *et al.*, 1998). Sua presença também foi relatada em indivíduos saudáveis na Europa e nos Estados Unidos. Os genótipos 1 e 2 do TTV são os mais comuns no mundo todo (Okamoto *et al.*, 2000a).

Pouco se sabe sobre quais células ou qual órgão abriga e libera continuamente o TTV para a circulação (Maggi *et al.*, 2001). O DNA do TTV tem sido detectado no fígado e na bile em concentrações 10-100 vezes maiores do que o encontrado nas amostras de plasmas correspondentes, e em baixas concentrações nos extratos fecais (Okamoto *et al.*, 1998a; Ukita *et al.*, 1999; Rodriguez-Inigo *et al.*, 2000).

O TTV também tem sido detectado nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e na medula óssea (Okamoto *et al.*, 2000a,b) sugerindo que este vírus poderia replicar nas células linfóides, bem como nos hepatócitos. Além disso, culturas de PBMCs estimuladas com fitohemaglutinina (PHA) têm demonstrado infectar outras células e liberar consideráveis quantidades de TTV para o sobrenadante na cultura celular (Maggi *et al.*, 2001; Mariscal *et al.*, 2002). Previamente, Yu *et al.*, em 2002, reportaram uma

distribuição preferencial do vírus em células CD19+ (Células B) entre os vários componentes das PBMCs, enquanto Maggi *et al.* (2003) encontraram em crianças com doença respiratória aguda, uma correlação inversa entre carga do TTV e porcentagem de células T totais e células T helper, e uma direta correlação com porcentagem de células B.

Demonstrou-se que o TTV está presente no núcleo e no citoplasma de algumas células mononucleadas do sangue periférico. É possível que a infecção de células do sistema imune possa facilitar o escape do vírus da resposta imune. Tem sido sugerido que, atuando como um cavalo de Tróia (“*Trojan horse*”), o TTV quando no sangue periférico, as células podem servir como um reservatório para infecções crônicas e para a transmissão (Allan *et al.*, 1994; Berns, 1990; Zhong *et al.*, 2002).

A transmissão do TTV provavelmente ocorra parenteralmente, transplacentariamente ou ainda pela via oral-fecal (Okamoto *et al.*, 1998a; Kanda *et al.*, 1999; Morrica *et al.*, 2000). Chan *et al.* (2001) relataram a susceptibilidade da cérvix uterina à infecção pela maioria dos genótipos de TTV, sugerindo uma possível transmissão sexual.

1.4.4 Aspectos Imunológicos

Pouco se sabe sobre a vigilância imunológica do hospedeiro e da presença de anticorpos anti-TTV na circulação sanguínea. Ott *et al.* (2000), confirmaram a existência de uma resposta imune contra o TTV em amostras de soro de doadores de sangue de pacientes com hepatites de etiologia desconhecida, e também no soro de crianças e animais como cachorros, gatos, cabras, carneiros e coelhos. Foi observada a presença de anticorpos contra a região C-terminal da proteína recombinante ORF1 com 98.6% de reatividade sorológica, indicando a alta prevalência de infecção em pacientes com hepatite de etiologia desconhecida. Poucos estudos vêm sendo realizados para detecção de anticorpos anti-TTV, talvez devido à limitada compreensão sobre as respostas imunes induzidas pelo vírus e a dificuldade na obtenção de antígenos. Em um estudo realizado por Ott *et al.* (2000) na França, foi verificada elevada prevalência de anticorpos TTV-específicos (98%), enquanto que a detecção do TTV por PCR foi de 76,1%, nas mesmas amostras, indicando que a utilização da proteína recombinante da região ORF-1 poderia representar uma ferramenta útil no diagnóstico da infecção pelo TTV e tornaria possível a avaliação da resposta imune desenvolvida contra o vírus. Porém, estudos complementares devem ser realizados para investigar uma possível

reação-cruzada com proteínas de outros organismos, principalmente entre vírus de mesma espécie.

1.5 QUIMIOCINAS

Expressão de genes da resposta imune tem sido correlacionada com a patogênese do câncer cervical (Ghaderi *et al.*, 2000). Dentre os produtos de genes envolvidos no recrutamento de macrófagos para a mucosa cervical, as citocinas e a expressão de seus receptores têm demonstrado provável função na imunidade contra o tumor cervical (Ghaderi *et al.*, 2000; Kleine-Lowinski. *et al.*, 1999; Ohta. *et al.*, 2002).

As quimiocinas constituem uma grande família de mediadores inflamatórios e imunológicos, e apresentam algumas similaridades com as citocinas, bem como diferenças claras. Assim como as citocinas, as quimiocinas são proteínas secretórias produzidas por leucócitos e células teciduais constitutivamente ou após indução, e exercem seus efeitos localmente de forma autócrina ou parácrina. Entretanto, as quimiocinas são muito menores que as citocinas e desempenham sua atividade via receptores com sete α -hélices transmembrana acoplados à proteína G, os quais são típicos para atração de leucócitos (Baggiolini, 2001).

Quimiocinas são constituídas de 70 a 130 aminoácidos com quatro resíduos de cisteína conservados (Baggiolini *et al.*, 1994, 1997). Como proteínas secretórias, são sintetizadas com uma seqüência guia de 20-25 aminoácidos, a qual é retirada antes de sua liberação. Duas famílias principais, CXC e CC, também conhecidas como α e β quimiocinas, são distinguidas de acordo com a posição dos dois primeiros resíduos de cisteína, os quais são separados por um aminoácido variável (CXC) ou são adjacentes (CC). As cisteínas formam duas pontes dissulfeto (Cys1 \rightarrow Cys3 e Cys2 \rightarrow Cys4), o que confere às quimiocinas sua estrutura tri-dimensional. As pontes dissulfeto mantêm as regiões amino-terminais juntas, o que é essencial para sua atividade biológica (Baggiolini, 2001).

Em soluções concentradas, diversas quimiocinas se associam para formarem dímeros (Clowre *et al.*, 1990; Baldwin *et al.*, 1991). A estrutura geral dos dímeros é diferente para quimiocinas CXC e CC. Originalmente, acreditava-se que interagiam com seus receptores através de mecanismos distintos, entretanto descobriu-se que a tendência de formar

dímeros varia, e que algumas quimiocinas são sempre monoméricas, como a MCP-3 (Kim *et al.*, 1996).

Uma nomenclatura sistemática para as quimiocinas e para seus receptores se tornou necessária com a descoberta de muitas moléculas novas. Esta classificação (Zlotnik & Yoshie, 2000) baseia-se no princípio estabelecido para os receptores na Conferência Gordon sobre Citocinas Quimiotáticas de 1966. Os receptores são definidos como CXC, CC, XC e CX3C, seguidos pela letra R (receptor) e um número. As quimiocinas são definidas seguindo o mesmo padrão, baseado em sua estrutura, seguidas pela letra L (ligante) e pelo número de seu gene. Enquanto que a nomenclatura sistemática tem sido adotada para os receptores, a maioria das quimiocinas ainda é distinguida por seus nomes tradicionais (Baggiolini, 2001).

1.5.1 Receptores de Quimiocinas

Seis receptores para quimiocinas CXC e dez para CC já foram identificados, além dos receptores para a linfotactina e fractalcina. A maioria dos receptores reconhece mais de uma quimiocina e muitas quimiocinas se ligam a mais de um receptor (Baggiolini, 2001). Contudo os receptores CC ligam-se somente às quimiocinas CC, e do mesmo modo os receptores CXC ligam-se somente às quimiocinas CXC. Esta restrição ligante-receptor provavelmente está relacionada às diferenças estruturais entre as quimiocinas CC e CXC, as quais têm estruturas primárias, secundárias e terciárias similares, mas quaternárias diferentes (Lodi *et al.*, 1994).

Estudos relacionados à identificação dos domínios das quimiocinas que estão envolvidos na sua ligação com o receptor e sua ativação foram descritos primeiramente com a IL-8. A sequência da região amino terminal foi revelada como essencial na atividade da IL-8 (Hebert *et al.*, 1991; Clark-Lewis *et al.*, 1991, 1993), e após a clonagem dos receptores de IL-8, verificou-se que tal sequência é essencial para sua ativação através da ligação a quimiocinas (Baggiolini *et al.*, 1994, 1997). Entretanto, os efeitos da IL-8 não podem ser mimetizados com oligopeptídeos contendo a sequência Glu-Leu-Arg-Cys (Clark-Lewis *et al.*, 1993). Estes resultados indicam que outros sítios de reconhecimento são necessários. (Clark-Lewis *et al.*, 1995, 1993). O sucesso destes experimentos motivou estudos similares com muitas outras quimiocinas, os quais confirmaram a importância da região amino terminal para a ativação do receptor. Estudos mais recentes com o SDF-1 (CXCL12), o ligante específico

para o CXCR4 – o qual é amplamente expresso em leucócitos e células de tecidos e também é um co-receptor para o HIV (Murphy *et al.*, 2000) – levou à identificação de seqüências para o reconhecimento e ativação do receptor (Crump *et al.*, 1997; Zlotnik & Yoshie, 2000). Os primeiros resíduos amino terminais, Lys-Pro, são essenciais para a ativação: a deleção da lisina diminui drasticamente sua atividade, enquanto que a deleção de ambos aminoácidos inativa totalmente a quimiocina (Crump *et al.*, 1997).

Coletivamente os estudos das relações estruturais com a atividade mostraram que as quimiocinas CXC e CC têm dois sítios principais de interação com seus receptores, um situado no domínio amino terminal e o outro no “loop” rígido após a segunda cisteína. Ambos são mantidos próximos por pontes dissulfeto (Baggiolini, 2001).

A identificação de um grande número de receptores de quimiocinas e a caracterização de sua seletividade e expressão em diferentes tipos de leucócitos tem fornecido informações sobre a regulação do tráfego de leucócitos na saúde e doença. Fagócitos sangüíneos expressam diferentes tipos e combinações de receptores de quimiocinas, CXCR1 e CXCR2, os receptores de IL-8, são encontrados exclusivamente em neutrófilos, os quais estão envolvidos principalmente da defesa contra bactérias. Monócitos, eosinófilos e basófilos compartilham alguns receptores e expressam outros com exclusividade (CCR3 em eosinófilos e basófilos e CCR5 em monócitos) e, portanto, podem ser recrutados seletivamente por quimiocinas apropriadas (Baggiolini, 2001).

1.5.2 Receptor para Quimiocina 5 (CCR5)

O CCR5 (Figura 6), receptor de quimiocinas da família CC (β -quimiocinas), apresenta sete domínios transmembrana hidrofóbicos e exerce sua atividade via proteína G. Liga-se às quimiocinas RANTES (CCL5), MIP-1 α (CCL3) e MIP-1 β (CCL4) (Samson *et al.*, 1996) e é codificado pelo locus CMBKR5 localizado no cromossomo 3 (Zimmerman *et al.*, 1997).

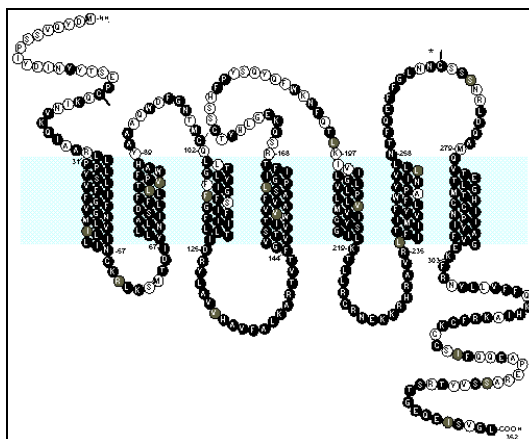


Figura 6 – Receptor de Quimiocina 5 (CCR5). Estrutura dos aminoácidos do CCR5 com sete domínios transmembrana hidrofóbicos. Fonte: [Center for Disease Control and Prevention](http://www.aegis.com/pubs/cdc_eid/1997/EID3302-Fig1.gif).
http://www.aegis.com/pubs/cdc_eid/1997/EID3302-Fig1.gif

O receptor CCR5 está envolvido na quimiotaxia de leucócitos para os sítios de inflamação (Murphy *et al.*, 1994; Baggiolini, 1998; Proost *et al.*, 1996). Desempenha um importante papel no recrutamento de macrófagos, monócitos e células T na inflamação (Panzer *et al.*, 2005; Spagnolo *et al.*, 2005) e é normalmente expresso em linfócitos T e células dendríticas, dirigindo a resposta imune preferencialmente para Th1 (Loetscher *et al.*, 1998).

Foi identificado um polimorfismo no gene do receptor CCR5, o qual consiste na deleção de 32 pares de bases, sendo denominado de CCR5 Δ 32 (Liu *et al.*, 1996). Esta variante resulta em uma forma não funcional de receptor, impedindo a sua interação com suas quimiocinas ligantes (Smith *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2004; Sidoti *et al.*, 2005).

O alelo CCR5 Δ 32 é comum entre europeus caucasóides (frequência alélica 0,05 - 0,15), porém raro ou ausente na maioria dos outros grupos étnicos, como nativos africanos e ameríndios (McNicholl *et al.*, 1997; Martinson *et al.*, 1997; Anzala, *et al.*, 1998; Stephens *et al.*, 1998; Leboute *et al.*, 1999; Martinson *et al.*, 2000). A ausência desta variante também foi relatada na população nativa da América do Sul, em populações nativas da Amazônia brasileira (Leboute *et al.*, 1999; Chies e Hutz, 2003) e também em asiáticos (O'Brien & Moore, 2000; Wang *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2005).

As diferenças na distribuição mundial do alelo CCR5 Δ 32 podem ser explicadas pela hipótese de que esta mutação surgiu na população caucasóide (Libert *et al.*, 1998) e teve sua frequência rapidamente aumentada devido a forte pressão seletiva,

possivelmente originada por patógenos que infectam macrófagos: *Yersinia pestis*, *Shigella*, *Salmonella* ou *Mycobacterium tuberculosis* (Lenski *et al.*, 1988; Stephens *et al.*, 1998). Muito provavelmente teve sua origem na Islândia ($fr=0.14$; Martinson *et al.*, 1997), e aparentemente esta deleção disseminou-se nos séculos VIII, IX e X com os ataques Vikings (Poser *et al.*, 1994).

Diversos estudos sustentam que a deleção CCR5 Δ 32 poderia estar associada à resistência à infecção pelo HIV (Dean *et al.*, 1996; Samson *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996; Zuniga *et al.*, 2003), e que confere proteção contra asma, artrite reumatóide, esclerose múltipla, e rejeição de enxerto renal em caucasóides (Zuniga *et al.*, 2003).

Análises *in vitro* de monócitos de portadores CCR5 Δ 32 demonstraram uma reduzida resposta quimiotática aos ligantes do CCR5 (Panzer *et al.*, 2005). Uma vez que a molécula de CCR5 é normalmente expressa em macrófagos, linfócitos T e células dendríticas e dirige a resposta imune, preferencialmente, para o padrão Th1 (Loetscher *et al.*, 1998) e como a resposta Th1 está associada com a inflamação, o alelo CCR5 Δ 32 não funcional resulta em uma resposta Th1 menos efetiva, conseqüentemente levando a um estado inflamatório mais brando (Chies & Hutz, 2003).

2 JUSTIFICATIVA

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer de colo do útero é a terceira neoplasia maligna mais comum entre as mulheres, sendo superado pelo câncer de pele (não-melanoma) e pelo câncer de mama. Ela ainda é a quarta causa de morte por câncer em mulheres.

O desenvolvimento do câncer cervical está fortemente relacionado com a infecção genital de papilomavírus humano (HPV) oncogênico, contudo, a importância dos fatores genéticos e ambientais no desenvolvimento de tumor cervical ainda não tem sido esclarecida.

Zheng *et al.* (2006) relataram que a deleção de 32 pares de bases no gene do receptor de quimiocina 5 está discretamente associada com um aumento do risco de infecção por HPV.

Tem sido sugerido que o TTV pode ser um vírus co-infectante que promoveria o efeito patológico de outros agentes infecciosos como o HPV. Alguns autores têm sugerido que a coinfeção do TTV genogrupo 1 e HPV, promoveria a progressão do carcinoma de células escamosas da laringe e estaria associada ao prognóstico desfavorável; além disso há relatos de um possível envolvimento do TTV na patogênese do Linfoma de Hodgkin em adultos jovens.

Pensava-se que o TTV seria um novo candidato a vírus da hepatite e apesar do seu papel na doença hepática permanecer controverso, e seu potencial patogênico seja totalmente caracterizado, será relevante investigar as implicações da co-infecção do TTV com outros vírus. Portanto este trabalho tem como proposta, investigar se o TTV e o polimorfismo do gene CCR5 poderiam influenciar na patogênese do HPV, e assim favorecer o desenvolvimento do câncer cervical em pacientes coinfectadas por HPV-TTV.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença do *Torque Teno Vírus* (TTV) e o polimorfismo do receptor de CCR5 em pacientes negativos para infecção pelo papilomavírus humano (HPV) e pacientes com colpocitologia oncótica sugestiva para infecção por HPV.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Analisar a faixa etária dos grupos HPV negativo e sugestivo para infecção por HPV;
- B) Analisar a microbiota da região cérvico-vaginal em pacientes sugestivos para HPV com câncer;
- C) Investigar a presença do TTV:
 - Em pacientes negativos para infecção por HPV e em pacientes sugestivos para infecção por HPV sem e com câncer.
- D) Seqüenciar e comparar as amostras positivas para o TTV, com as seqüências depositadas no *GenBank*;
- E) Realizar análise genotípica para o polimorfismo do receptor de quimiocina CCR5 em pacientes negativos para HPV e pacientes sugestivos para infecção por HPV.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

As amostras utilizadas neste trabalho foram provenientes do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina e da Universidade Estadual de Maringá, as quais constituíram de dois grupos: 43 pacientes HPV negativo (controle negativo) e 74 pacientes sugestivos para infecção por HPV, diagnosticados pelo método de Papanicolaou. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Estadual de Londrina, estando de acordo com a Resolução 196/96 - CNS.

4.2 ANÁLISE CITOLÓGICA

Esta etapa do trabalho foi realizada no Hospital Regional Universitário da Universidade Estadual de Londrina e da Universidade Estadual de Maringá. Para a coleta das amostras cérvico-vaginais, as pacientes foram aconselhadas a não fazerem uso de duchas higiênicas, nem medicamentos nas 48 horas que precediam a coleta do exame, bem como fazer abstinência sexual no mesmo período. As amostras foram coletadas utilizando o espéculo vaginal para visualização do colo uterino; com a espátula de Ayre, foi realizado o raspado da ectocérvice; e com a escova cervical, (*cytobrush*), a coleta endocervical. O esfregaço cérvico-vaginal foi fixado com etanol absoluto (fixador celular), a fim de evitar a ação de enzimas autolíticas, as quais poderiam alterar a morfologia celular. A coloração foi realizada de acordo com o Método de Papanicolaou (Anexo I).

A análise da microbiota vaginal foi realizada no Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina, através da bacterioscopia ao Gram e exame a fresco (Anexo II).

4.3 ANÁLISE MOLECULAR

4.3.1 Obtenção do DNA

Para obtenção do DNA, foi coletada uma alíquota de sangue periférico por punção venosa, com tubos de coletas a vácuo, com anticoagulante EDTA. A técnica utilizada para a extração do DNA origina uma molécula de alto peso molecular e consiste basicamente no rompimento enzimático de membranas celulares, eliminação de proteínas e ácidos graxos por ação de solventes orgânicos e precipitação do DNA com etanol (Miller *et al*, 1988).

Ressuspendeu-se o DNA obtido em 50 µL de água ultra pura (água milli-Q) autoclavada. A concentração do DNA foi determinada por espectrofotometria a 260 nm (UV-1650 PC/ UV-Visible Spectrophotometer, Shimadzu, Japan), usando a seguinte fórmula: densidade óptica obtida a 260 nm (DO_{260}) x diluição x 50 = µg de DNA. A concentração foi ajustada para 0,1 µg/ µL e as amostras foram mantidas a -20°C até a etapa da PCR para detecção qualitativa do TTV. A integridade do DNA extraído foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo e visualizado em transluminador UV.

4.3.2 Detecção Qualitativa do TTV

A presença do TTV foi determinada pela *nested* PCR utilizando quatro oligonucleotídeos iniciadores, descritos por Nishizawa et al (1997) e confirmados de acordo com a seqüência no *GenBank* AB008394.

1° PCR

- RD037 *primer sense*: 5' GCA GCA GCA TAT GGA TAT GT 3'
- RD038 *primer anti-sense*: 5' TGA CTG TGC TAA GGC CTC TA 3'

2° PCR

- RD051 *primer sense*: 5' CAT ACA CAT GAA TGC CAG GC 3'
- RD052 *primer anti-sense*: 5' GTA CTT CTT GCT GGT GAA AT 3'

O produto da PCR desse sistema é um fragmento de DNA de 197 pb localizado na seqüência aberta de leitura 1 (ORF 1) denominada região N22.

As condições das duas reações de amplificação foram as mesmas, e foi realizada utilizando as soluções: 10X PCR *Buffer*, MgCl₂ (50 mM), dNTP (1,25 mM), *Primer sense* (2,5 µM), *Primer anti-sense* (2,5µM), H₂O estéril ultra pura (*milli-Q*), Taq Polimerase (1,25 U/reacção) (INVITROGEN *life technologies*- Brasil). Amostra de DNA genômico/ produto do PCR 1 (0,1 µg/µl).

A reação de amplificação foi realizada no termociclador *PCR Sprint-Thermo Hybaid*[®] (Biosystems, Barcelona, Spain), onde a temperatura inicial de desnaturação foi de 94°C por dez minutos, seguida de 35 ciclos de trinta segundos a 94°C para separar a dupla fita de DNA, 30 segundos a 55°C para temperatura de anelamento e quarenta e cinco segundos a 72°C para extensão das cópias, com extensão final de 10 minutos a 72°C. Todas as reações foram efetuadas com um controle negativo (ausência de DNA) para assegurar a não contaminação com ácidos nucleicos, e com um controle positivo, no qual utilizou-se DNA de amostra previamente testada e sequenciada. As amostras foram analisadas e visualizadas em gel de poliacrilamida 10%, coradas com nitrato de prata.

4.3.2.1 Clonagem

A fim de verificar a especificidade dos *primers* utilizados na detecção do TTV, os produtos de PCR *nested* das amostras positivas para o TTV foram clonados.

4.3.2.1.1 Purificação das Amostras

As amostras positivas para TTV foram purificadas, com o objetivo de eliminar restos de *primers* e fragmentos inespecíficos. Inicialmente 15 µL do produto da PCR *nested* TTV foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,4% e corados com brometo de etídeo e o fragmento de 197pb do TTV a ser analisado foi recortado e purificado utilizando o sistema de extração o *QIAgen - QIAquick Gel Extraction Kit Protocol*, seguindo as instruções do fabricante.

4.3.2.1.2 Preparação de Células Competentes

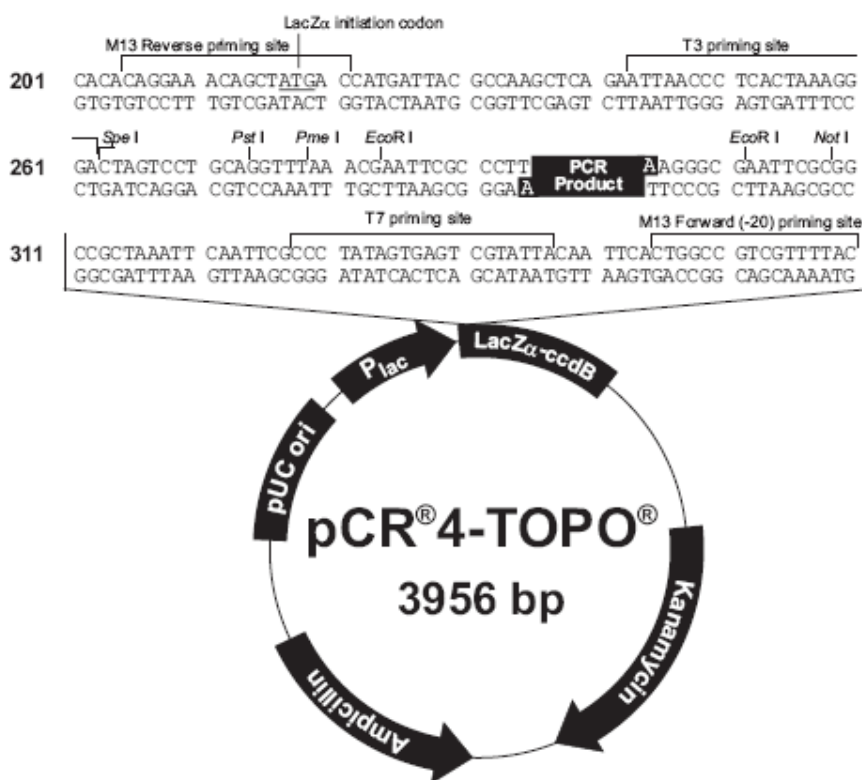
Foram inoculadas 20 μL de *Escherichia coli*, da linhagem Top-10, em um tubo de ensaio contendo 3 mL de meio Luria-Bertani (LB) líquido, e depois incubados por aproximadamente 20 horas, em agitador horizontal a 180 rpm, a 37°C. Após a incubação, 150 μL da cultura bacteriana foram inoculados em 5 mL de meio LB líquido e mantidos a 37°C e 180 rpm em agitador horizontal, até atingir uma densidade óptica (DO_{660}) de 0,4-0,6. Em seguida o tubo foi mantido em banho de gelo por 5 min. e depois 3 mL dessa cultura foram transferidos para 2 tubos de microcentrífuga (1,5 mL) e centrifugados a 5000 rpm, por 5 min.

O sobrenadante foi descartado por inversão do tubo e 500 μL de CaCl_2 (50mM) foram adicionados. Após homogeneização, juntou-se o conteúdo dos 2 microtubos mantendo-o em banho de gelo por 10 min. Foi realizada nova centrifugação a 5000 rpm, por 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e ao sedimento foram adicionado 300 μL de CaCl_2 50mM e, depois, mantido em banho de gelo por mais 20 min. Ao final do tempo, as células competentes foram aliquotadas (50 μL /tubo).

4.3.2.1.3 Reação de Ligação

Para a reação de ligação foi utilizado o vetor pCR®4-TOPO®, o qual permite selecionar diretamente os recombinantes através da desativação do gene letal *ccdB* da *E.coli* Top10 (Bernard & Couturier, 1992; Bernard *et al.*, 1994; Bernard *et al.*, 1993). Este vetor contém o gene *ccdB* ligado à porção C-terminal do fragmento *LacZ α* e a ligação do produto de PCR interrompe a expressão do gene *LacZ α -ccdB* (Anexo III). Deste modo, somente haverá o crescimento de *E. coli* Top10 transformadas.

O vetor pCR®4-TOPO® apresenta a seguinte seqüência e característica (www.invitrogen.com):



Para a ligação do produto de PCR purificado do TTV com o vetor pCR®4-TOPO® (TTV-pCR®4-TOPO®) foram adicionadas num tubo de microcentrífuga (0,6mL) as soluções: produto PCR purificado na proporção 1 vetor : 4 fragmento; solução de sal* 1 µL; Vetor pCR®4-TOPO®* 1 µL; água esterilizada qsp 6µL.

* INVITROGEN *life technologies*- Brasil

4.3.2.1.4 Transformação

Foram utilizado 50 µL de células competentes, aos quais foram adicionados 3 µL do produto da ligação (TTV-pCR®4-TOPO®). As células foram mantidas em banho de gelo por 20 min. Na seqüência, foram incubadas em banho-maria a 42°C por 2 min. E, a seguir, transferidas imediatamente para banho de gelo. Após adição de 1 mL de meio LB líquido as células foram incubadas por 1 hora a 37°C sob agitação (180 rpm). Ao final do tempo, a amostra foi centrifugada a 5000 rpm, por 10 min., o sobrenadante foi descartado e ao sedimento foram adicionados 100 µL de meio LB líquido. As amostras foram inoculadas,

com auxílio da alça de *Drigalsk*, em placas de *petri* contendo meio LB sólido acrescido de gentamicina (50-100 µg/mL) e depois incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. As colônias isoladas foram utilizadas para extração de DNA plasmidial.

4.3.2.1.5 Extração do DNA Plasmidial (Mini-Prep)

A extração do DNA plasmidial foi realizada usando o sistema Kit *GFX Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Pharmacia Biotech Incorporation, USA)*, seguindo as instruções estabelecidas pelo fabricante.

4.3.2.2 Seqüenciamento

O DNA plasmidial foi quantificado e submetido à reação de seqüenciamento no termociclador *Eppendorf mastercycler gradient* com *DYEnamic™ ET dye terminator cycle sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, Inc, Ohio, USA)*, onde foram realizados 30 ciclos de trinta segundos a 95°C para desnaturar a dupla fita de DNA, quinze segundos a 53°C para temperatura de anelamento e um minuto a 60°C para extensão das cópias.

Os reagentes foram utilizados nas seguintes concentrações: *DYEnamic ET reagent premix* 4µL; *Primer M13 foward* e *M13 reverse* (10pmoles) 2µL; *TTV-pCR®4-TOPO®* (300 ng/µL) 4µL.

Foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos iniciadores:

Primer sense (M13 Foward): GAC GTT GTA AAA CGA CGG CCA GT

Primer anti-sense (M13 Reverse): TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC

Os produtos da reação de sequenciamento foram precipitados com 10µL de água milli-Q autoclavada, 2 µL de acetato de amônio 7,5M estéril e 60µL de etanol 96%. Centrifugados por 15 segundos a 300rpm e mantidos em repouso por 15 minutos a 25°C. Novamente centrifugados a 4000rpm a 25°C por 45 minutos o sobrenadante vertido. Adicionou-se 140µL de etanol 70% com posterior centrifugação a 4000rpm por 14 minutos. O sobrenadante foi vertido, o sedimento seco foi mantido a 37°C por 15 minutos e

ressuspendido em 10µL de tampão (*Loading buffer for Mega Bace*), após esta solução foi submetida ao seqüenciamento no seqüenciador automático Mega Bace 1000™ (Amershan Pharmacia Biotech – USA).

4.3.3 Análise do Polimorfismo do Gene Ccr5 pela reação em Cadeia da Polimerase (Pcr)

Os *primers* para CCR5 utilizados para a amplificação do DNA foram sintetizados de acordo com a seqüência *GenBank* AF009962.

- *Primer sense*: 5' ACC AGA TCT CAA AAA GAA 3'
- *Primer anti-sense*: 5' CAT GAT GGT GAA GAT AAG CCT CA 3'

A condição da reação de amplificação foi realizada utilizando-se as soluções: 10X PCR *Buffer* *, MgCl₂ (50 mM) *, dNTP (1,25 mM) **, *Primer sense* (2,5 µM), * H₂O estéril ultra pura (*milli-Q*), Taq Polimerase (1,25 U/reação) *, Amostra de DNA genômico (0,1 µg/µl).

* INVITROGEN *life technologies* – Brasil.

** Amershan Pharmacia Biotech Incorporation, USA.

A reação de amplificação foi realizada no termociclador *PCR Sprint-Thermo Hybaid*® (Biosystems, Barcelona, Spain), onde a temperatura inicial de desnaturação foi de 94°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de um minuto a 94°C para desnaturar a dupla fita de DNA, um minuto a 58°C para temperatura de anelamento e um minuto a 72°C para extensão das cópias, com extensão final de 10 minutos a 72°C.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A frequência do alelo Δ32 foi calculada como: $[1 \times (h + 2H)] / 2N$, onde h representa o genótipo heterozigoto, H o genótipo homozigoto e N o tamanho da amostra para cada população. Os dados epidemiológicos foram determinados através do teste de χ^2 . Para todos os dados, o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Para as características demográficas, utilizou-se o teste t Student do programa Microcal Origin™ 4.1.

5 RESULTADOS

A análise colpocitológica do cérvix uterino dos pacientes que participaram deste trabalho foi realizada método de Papanicolaou, sendo agrupados inicialmente em pacientes negativos para HPV e pacientes com colpocitologia oncótica sugestiva para infecção por HPV.

No presente trabalho, foram analisadas 117 amostras de sangue periférico, provenientes de pacientes dos Hospitais de clínicas da Universidade Estadual de Londrina e Universidade Estadual de Maringá. Sendo 43 amostras negativas para HPV e 74 amostras sugestivas de infecção por este vírus.

Com relação à faixa etária, no grupo HPV negativo houve um maior número de pacientes entre 51-60 anos e no grupo sugestivo para infecção por HPV, entre 31-40 anos (Figura 1).

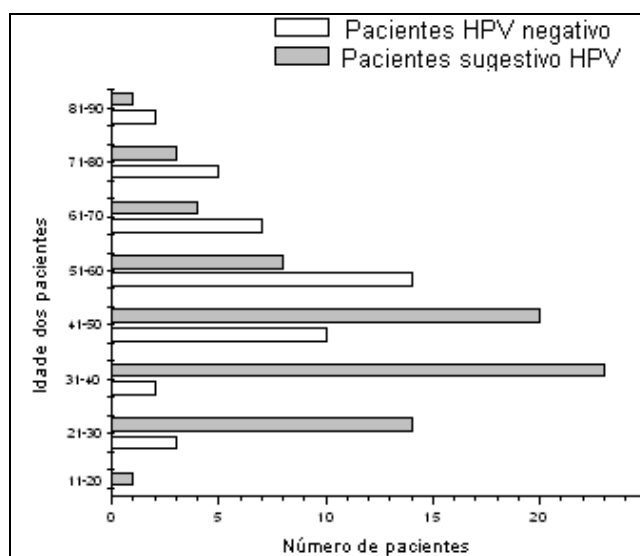


Figura 1 – Faixa etária dos pacientes. No grupo HPV negativo houve um maior número de pacientes entre 51-60 anos e no grupo sugestivo para HPV, entre 31-40 anos.

Dentre os pacientes sugestivos de infecção por HPV (n=74), 81% (60) não apresentaram diagnóstico positivo para câncer e 19% (14) dos pacientes desenvolveram esta doença (Figura 2).

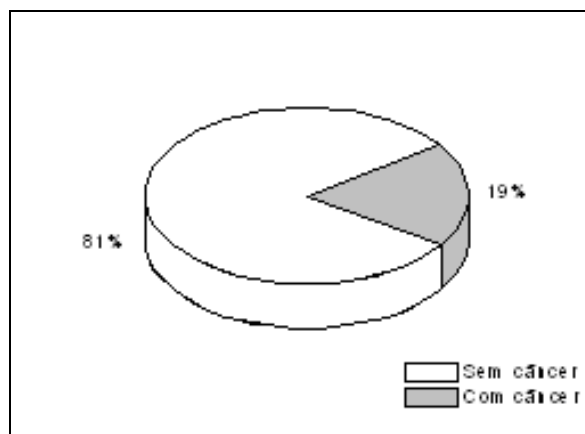


Figura 2 – Distribuição dos pacientes sugestivos para HPV. Dentre as amostras analisadas, em 81% dos pacientes não foi detectado nenhum tipo de câncer enquanto que 19% dos pacientes apresentaram câncer cervical, utilizando método de Papanicolaou, como descrito em Material e Métodos.

Dentre os pacientes com câncer cervical (14), 7 desenvolveram carcinoma epidermóide invasor e 7 desenvolveram carcinoma *in situ*. Os pacientes apresentaram faixa etária entre 29 e 44 anos (Figura 3), sendo que a maioria apresenta-se na faixa etária entre 35 a 40 anos.

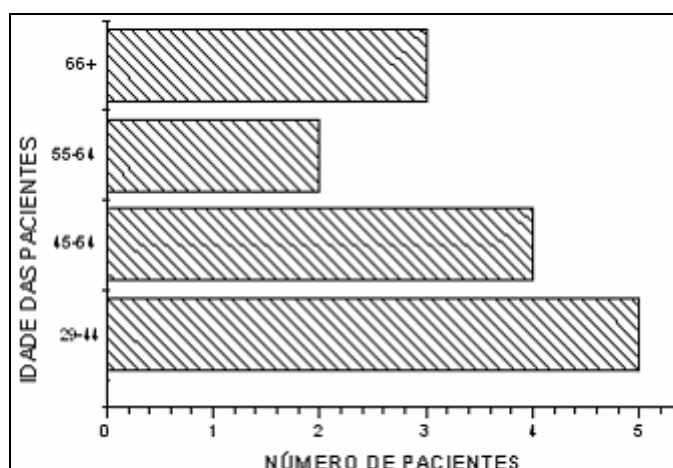


Figura 3 – Faixa etária dos pacientes sugestivos para HPV e com câncer. Neste grupo (n=14), houve um discreto predomínio de pacientes com faixa etária entre 29-44 anos.

A próxima etapa deste trabalho foi verificar se os pacientes com carcinoma apresentavam co-infecções para outros microrganismos, relacionados à microbiota da região cérvico-vaginal. Para esta análise, foi realizada bacterioscopia ao Gram e exame a fresco

(Anexo II) a fim de detectar microrganismos presentes na região cérvico-vaginal em pacientes com infecção sugestiva para HPV e com câncer. Foram detectados *Gardnerella vaginalis* e *Trichomonas vaginalis* nestes pacientes (Figura 4).

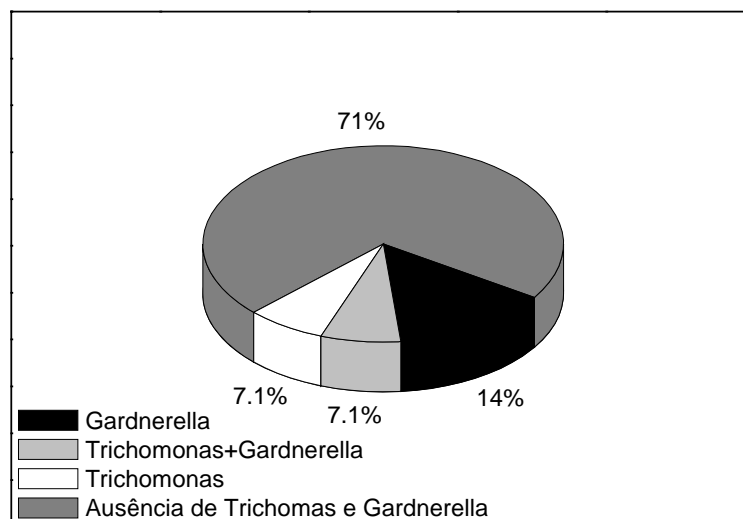


Figura 4 – Detecção de *Gardnerella vaginalis* e *Trichomonas vaginalis* em pacientes sugestivos para HPV e com câncer. A detecção de agentes infecciosos da região cérvico-vaginal foi realizada através da bacterioscopia ao Gram e exame a fresco.

A etapa seguinte deste trabalho foi detectar a presença do DNA do TTV no sangue periférico de todas as amostras. Neste Laboratório, rotineiramente é realizada a análise da integridade do DNA das amostras. Esta análise é realizada através de eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) corado com brometo de etídio e visualizado em ultra-violeta, apresentando um perfil eletroforético típico de uma amostra íntegra. Todas as amostras apresentaram bandas únicas com concentração compatível em relação ao padrão de DNA (100ng/ μ l), demonstrando que não houve degradação das amostras de DNA durante sua extração e que as mesmas estavam íntegras. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro a 260 nm.

Além da análise da integridade através de perfil eletroforético, todas as amostras foram amplificadas para o gene constitutivo CCR5, sendo portanto, amostras íntegras e viáveis para detecção do DNA do TTV. A partir das amostras íntegras de DNA, realizou-se PCR para o TTV, utilizando-se *primers* específicos, como descrito anteriormente.

Na Figura 5, o resultado da amplificação pode ser visualizado em gel de poliacrilamida 10% (v/v), corado com prata. A detecção do TTV foi realizada pela PCR *nested* nos grupos negativos para HPV e sugestivos para HPV.

Figura 5A

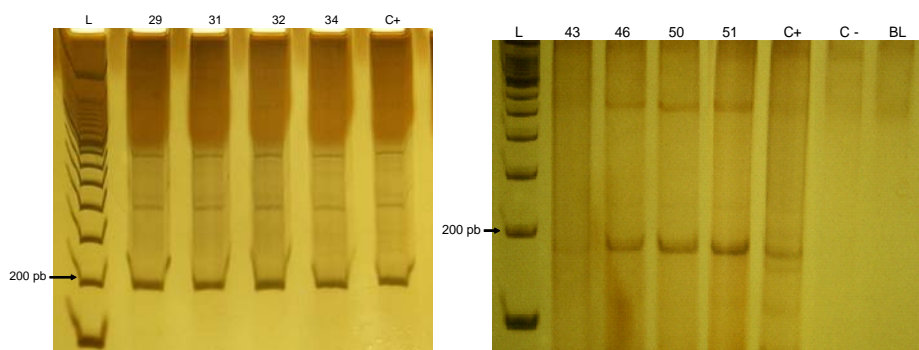


Figura 5B

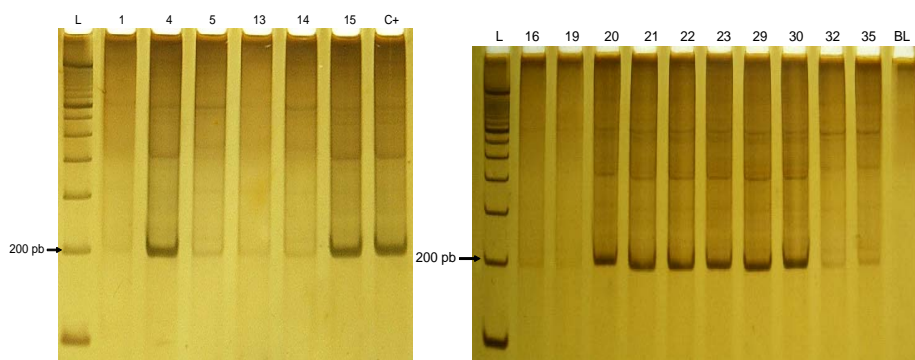


Figura 5 – Detecção do TT vírus através da PCR. Figura 5A Pacientes negativos para HPV. Grupo controle negativo. Figura 5B. Pacientes sugestivo para infecção por HPV. Gel de poliacrilamida 10% (v/v) corado com prata. Onde L representa o *Ladder* 100pb. Amostras positivas para o TTV apresentaram 197pb. C+ controle positivo. C – controle negativo.

Relacionando a presença de TTV entre os grupos avaliados neste trabalho, no grupo HPV negativo, 18.6% (8) dos pacientes estavam infectados pelo TTV e no grupo sugestivo para HPV, 24.32% (18) dos pacientes apresentaram essa infecção (Figura 6). Aplicando-se o teste de qui-quadrado, não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos, embora tenha sido observada uma tendência no aumento de TTV nos pacientes HPV sugestivos.

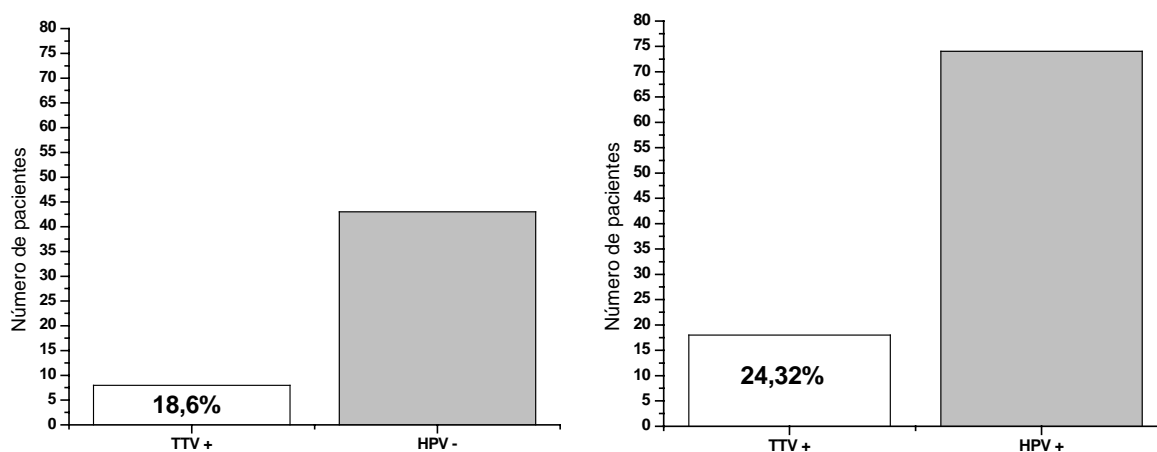


Figura 6 – Detecção do TTV em pacientes HPV negativos comparados com pacientes sugestivos para infecção por HPV. No controle negativo detectou-se 18,6% de TTV e 24,32% nos pacientes sugestivo de infecção por HPV. Valor de qui-quadrado igual 0,516 e grau de liberdade igual a 1.

Com relação à idade, dentre o grupo HPV negativo, houve uma maior detecção do TTV na faixa etária entre 41-60 anos e, dentre o grupo sugestivo de infecção por HPV, houve uma maior prevalência na faixa etária entre 31-40 anos.

A fim de verificar a especificidade dos *primers* utilizados para detecção de TTV, as amostras positivas foram clonadas e os plasmídeos extraídos foram seqüenciados. As seqüências obtidas foram analisadas e comparadas com as seqüências disponíveis no *GenBank* da NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), onde estas seqüências apresentaram identidade significativa com as seqüências do TTV cadastradas neste banco de dados ($E=9^{-87}$). O número de acesso é AJ244132 e a seqüência está localizada na região ORF1, entre as posições 61-301. O eletroferograma da seqüência obtida está representado na Figura 7.

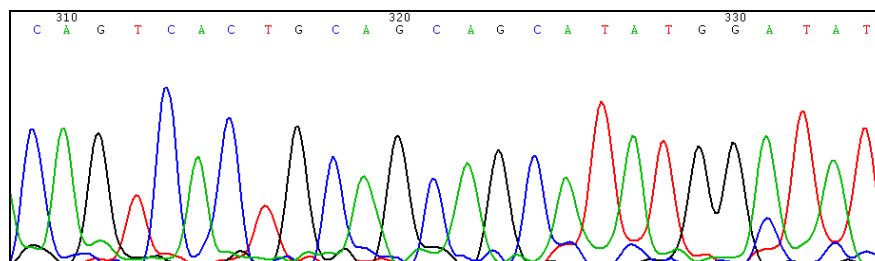


Figura 7 – Seqüenciamento automático do produto de clonagem do TTV. A clonagem do TTV e a reação de seqüenciamento foram realizadas segundo descrito em Materiais e Métodos. O cromatograma representa parte da seqüência do fragmento de produto de PCR-nested.

A seguir, avaliou-se a presença do TTV no grupo dos pacientes sugestivos para HPV e com câncer. Detectou-se TTV em 16,67% (10/60) dos pacientes sugestivos para HPV sem câncer, e no grupo sugestivo para HPV com câncer detectou-se 57,14% (8/14). Através do teste qui-quadrado verificou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos, com $p < 0,05$ (Figura 8).

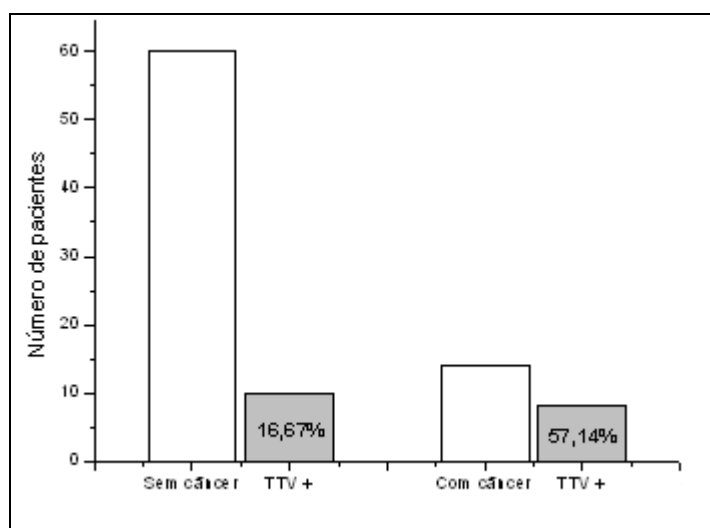


Figura 8 – Detecção do TTV em pacientes sugestivos para HPV sem câncer e com câncer. A detecção do TTV foi realizada como descrito em Materiais e Métodos. Em pacientes sem câncer houve uma menor porcentagem de pacientes infectados pelo TTV quando comparado com os pacientes com câncer. Valor de qui-quadrado igual a 10,07 e grau de liberdade igual a 1.

Neste trabalho, também foi realizada a análise genotípica para o polimorfismo do receptor de quimiocina CCR5, utilizando-se as mesmas amostras de DNA empregadas para detecção de TTV (Figura 9).

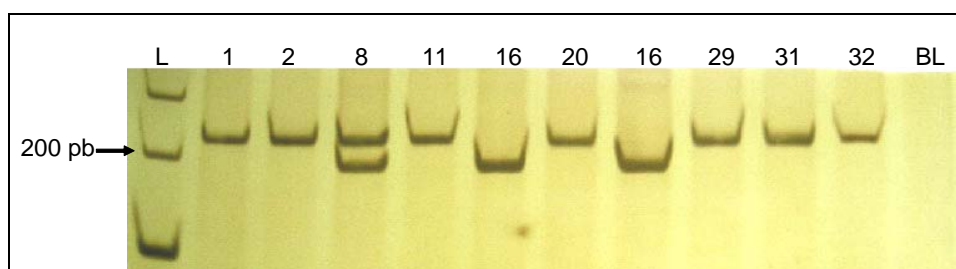


Figura 9 – Análise genotípica do receptor de quimiocina 5 em pacientes HPV negativos. Gel de poliacrilamida 10% (v/v) corado com prata. L representa o *Ladder* 100pb. Representação dos tipos de genótipos através das amostras 1, 2, 11, 20, 29, 31, 32 (225pb) genótipo selvagem para o CCR5; amostra 8 genótipo heterozigoto (193pb e 225pb); e amostra 16 (193pb) - genótipo homozigoto para o alelo variante.

A análise do polimorfismo do gene CCR5 demonstra uma distribuição genotípica similar entre os pacientes negativos para infecção por HPV e pacientes sugestivos para infecção por HPV (Tabela 1).

Tabela 1 – Frequência alélica e genotípica para os alelos $\Delta 32$ e wt do CCR5

Grupo estudado	Número de amostras	Genótipo (117) ^a			Frequência alélica	
		CCR5/CCR5	CCR5/ $\Delta 32$	$\Delta 32/ \Delta 32$	wt	$\Delta 32$
HPV negativo	43 *	38	04	01	0.93	0.07
HPV sugestivo	74 **	70	03	01	0.97	0.03

* Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) = 3,429

** HWE = 13,48

^a HPV negative patients X HPV suggestive patients $\chi^2 = 1,47$ (2 degrees of freedom; $p > 0.05$)

Apesar do predomínio do genótipo selvagem (CCR5/CCR5), observou-se que 11,6% dos pacientes HPV negativo apresentavam o alelo $\Delta 32$ e, dentre os pacientes sugestivos para infecção por HPV, 5,4% apresentaram este alelo variante. Ambos os grupos apresentaram um desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg e esta diferença pode ser atribuída ao pequeno número de amostras.

A próxima etapa deste trabalho foi analisar o polimorfismo do gene CCR5 relacionado com a presença do TTV. Observou-se uma distribuição genotípica semelhante entre o grupo controle negativo para HPV e o grupo sugestivo para HPV, bem como uma prevalência similar do TTV em ambos os grupos (Tabela 2 e Figura 10).

Tabela 2 – Relação do polimorfismo do gene CCR5 com HPV e TTV

PACIENTES HPV NEGATIVO (n=43)						
CCR5/CCR5 TTV -	CCR5/CCR5 TTV +	CCR5/ $\Delta 32$ TTV -	CCR5/ $\Delta 32$ TTV +	$\Delta 32/ \Delta 32$ TTV -	$\Delta 32/ \Delta 32$ TTV +	
31	7	3	1	1	0	
PACIENTES SUGESTIVOS PARA HPV (n=74)						
54	16	1	2	1	0	

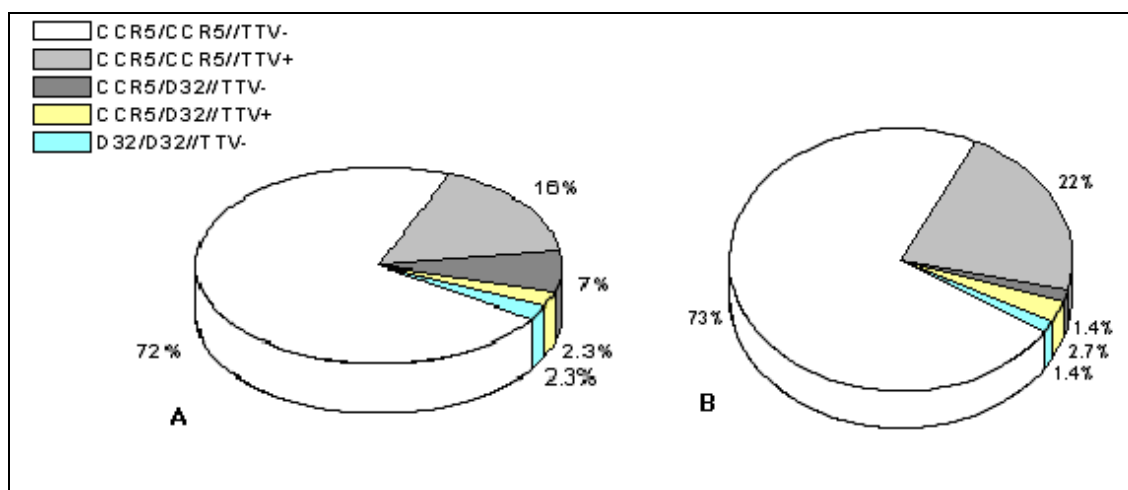


Figura 10 – Relação do polimorfismo do gene CCR5 com TTV. Figura 10.A – Pacientes negativos para HPV. Figura 10.B – Pacientes sugestivos para HPV. Em ambos os grupos não houve detecção do TTV em pacientes com o genótipo homozigoto para o alelo variante.

No grupo sugestivo para HPV sem câncer, observa-se um predomínio de pacientes com o genótipo selvagem para CCR5, mas sem infecção por TTV, já no grupo sugestivo para HPV com câncer, o que se observou foi uma maior ocorrência de pacientes com genótipo selvagem para CCR5, mas com infecção por TTV (Figura 11).

Em ambos os grupos não houve detecção do TTV em pacientes com o genótipo homozigoto para o alelo variante. Em pacientes sugestivo para HPV com câncer não houve ocorrência de pacientes com genótipo heterozigoto na ausência de TTV (Tabela 3 e Figura 11).

Tabela 3 – Relação do polimorfismo do gene CCR5 com TTV em pacientes sugestivos para HPV sem câncer e com câncer.

PACIENTES SUGESTIVOS PARA HPV SEM CÂNCER (N=60)					
CCR5/CCR5 TTV -	CCR5/CCR5 TTV +	CCR5/ Δ 32 TTV -	CCR5/ Δ 32 TTV +	Δ 32/ Δ 32 TTV -	Δ 32/ Δ 32 TTV +
48 (80%)	9 (15%)	1 (1,7%)	1 (1,7%)	1 (1,7%)	0
PACIENTES SUGESTIVOS PARA HPV COM CÂNCER (n=14)					
6 (43%)	7 (50%)	0	1 (7,1%)	0	0

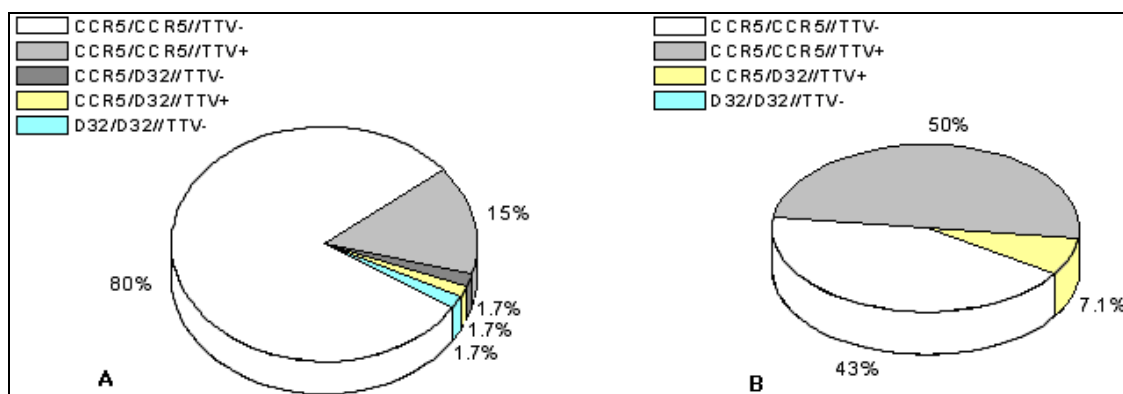


Figura 11 – Relação do polimorfismo do gene CCR5 com TTV em pacientes sugestivos para HPV. Figura 11.A – Pacientes sem câncer. Figura 11.B – Pacientes com câncer. Em ambos os grupos não houve relação entre TTV e polimorfismo do gene CCR5 com valor de qui-quadrado igual 0,3962 e grau de liberdade igual a dois, bem como nenhuma relação entre câncer e polimorfismo do gene CCR5, cujo qui-quadrado foi igual a 0,4453 e grau de liberdade igual a dois.

Dentre os sete pacientes que desenvolveram carcinoma epidermóide invasor, 6 apresentaram o genótipo selvagem para CCR5 e um paciente apresentou genótipo heterozigoto para este gene, sendo este o único paciente que apresentou metástase.

6 DISCUSSÃO

É estimado que o HPV cause aproximadamente meio milhão de novos cânceres todo ano e, a maioria, em mulheres de países em desenvolvimento (WHO, 2007).

O HPV é a infecção viral sexualmente transmissível mais prevalente entre homens e mulheres. É estimado que 80% dos adultos sexualmente ativos estejam infectados com pelo menos um tipo de HPV (Baseman & Koutssky, 2005).

Neste trabalho, foram avaliadas 117 amostras de sangue periférico, sendo 43 amostras negativas para HPV, e 74 amostras sugestivas de infecção por este vírus; a faixa etária predominante para este último grupo foi entre 31-40 anos (Figura 1). Dentre os pacientes sugestivos para HPV, a faixa etária dos pacientes sem câncer foi de 13-81 anos e dos os pacientes com câncer foi de 29-74 anos.

Ferlay *et al* (2001) relataram uma maior incidência de câncer cervical em mulheres com faixa etária entre 55-64 anos. No presente trabalho, a incidência de câncer cervical foi maior nas mulheres com faixa etária entre 29-44 anos (Figura 3), embora 11 pacientes apresentassem idade entre 41-74 anos.

Mikamo *et al* (1999) relataram a possibilidade de as lesões do câncer de cérvix uterina promoverem condições favoráveis ao crescimento de *Gardnerella vaginalis* e outros microrganismos anaeróbios, os quais levariam a uma vaginose bacteriana. Estes mesmos autores detectaram *Gardnerella vaginalis* em 50% (10/20) dos pacientes e, destes, 80% (8/10) apresentaram vaginose bacteriana. Em nosso estudo houve detecção de *Gardnerella vaginalis* em 14,29% dos pacientes (2/14), *Trichomas vaginalis* em 7,14% dos pacientes (1/14) e associação destes dois microrganismos em 7,14% dos pacientes (1/14). Essa baixa incidência pode ser atribuída ao método de detecção empregado em nosso trabalho, o qual foi realizado apenas pelo exame a fresco e pelo método de Gram (Figura 4).

Desenvolvimento do câncer cervical está fortemente relacionado com infecção genital com tipos de HPV oncogênicos, contudo, parecem ser necessários fatores adicionais. No entanto, a importância relativa dos fatores genéticos e ambientais no desenvolvimento de tumor cervical ainda não foi esclarecida (Zheng B. *et al*, 2006).

Tem sido sugerido que o TTV seja um vírus co-infectante que promoveria o efeito patológico de outros agentes infecciosos (Szládek *et al*, 2005) como o HPV. Pensava-se que o TTV pudesse ser um novo candidato a vírus da hepatite e apesar do seu papel na doença hepática permanecer controverso, até que o seu potencial patogênico seja totalmente

caracterizado, será relevante investigar as implicações da co-infecção do TTV com outros vírus (Thom e Petrik, 2007).

Moriyama *et al.* (2001) descreveram que a regeneração irregular de hepatócitos de pacientes TTV positivo foi muito mais significativa do que em pacientes TTV negativo. Kooistra *et al.* (2004) propuseram que a proteína indutora de apoptose derivada do TTV tem uma ação preferencial em carcinoma hepatocelular derivado de células. Camci *et al.* (2002) descreveram uma alta prevalência do TTV em pacientes com câncer.

Barril *et al.* (2000) verificaram a presença do TTV em soro e em células mononucleares periféricas de pacientes ambulatoriais de diálise peritoneal, utilizando *primers* para as regiões da ORF-1 e ORF-2 do TTV. Tem sido sugerido que células do sangue periférico, nos quais o vírus esteja escondido como um “Cavalo de Tróia”, possam servir como um reservatório de TTV, induzindo infecção e transmissão crônica em alguns setores clínicos e epidemiológicos (Zhong *et al.*, 2002).

Verificou-se que usando PCR com *primers* da região UTR, o DNA do TTV foi detectado numa porcentagem muito maior nas amostras. O DNA do TTV foi detectado por PCR UTR numa alta frequência (93%) sem diferença na prevalência entre doadores de sangue com níveis elevados de alanina amino transferase (ALT), daqueles com níveis normais. Esses resultados, demonstrados por Ito *et al.* (1999), indicaram que a seleção dos *primers* da PCR influencia na detecção do DNA do TTV. Além disso, estes resultados sugerem que um restrito genótipo de TTV detectado pela PCR da região N22 pode ser associado com danos hepáticos entre doadores de sangue. Demonstrou-se que a utilização de *primers* N22 detecta grupos virais associados com hepatites de origem desconhecida. Hu *et al.* (2005) investigaram a habilidade de um grupo de *primers* específicos detectar genótipos de TTV conhecidos e verificaram que o *set* de *primers* RD0.37/0.38/0.51/0.52 somente amplificam produtos de PCR para o genótipo 1. Desse modo, neste trabalho a presença do DNA do TTV em células do sangue periférico foi investigado usando *primers* N22 específicos para TTV genótipo 1.

A detecção do TTV, nos grupos negativo para HPV e sugestivo para HPV, foi realizada por PCR *nested* e a visualização em gel de poliacrilamida 10% (v/v) (Figura 5); no grupo HPV negativo foi detectado TTV em 18,6% dos pacientes e no grupo sugestivo para HPV, foi detectado em 24,32% dos pacientes (Figura 6).

As amostras de TTV positivas foram clonadas e os plasmídeos extraídos foram seqüenciados (Figura 7) e comparados com dados do *GenBank*, e os resultados demonstraram homologia com a seqüência de TTV cadastrado neste banco de dados.

Outros fatores relacionados à infecção por HPV tais como, carga viral, integração viral e múltiplas infecções podem modificar a interação biológica vírus-hospedeiro e desempenhar um papel no desenvolvimento do câncer cervical. A detecção foi realizada para analisar a possibilidade do TTV influenciar no desenvolvimento de câncer de colo do útero pelo HPV.

No presente trabalho, detectou-se TTV em 16,67% (10/60) dos pacientes sugestivos para HPV sem câncer, e no grupo sugestivo para HPV com câncer detectou-se 57,14% (8/14) (Figura 8). Deste modo, o TTV pode estar influenciando o desenvolvimento de câncer pelo HPV, talvez isso se deva ao fato de o TTV apresentar uma distribuição preferencial nas células CD19+ (Células B) entre os vários componentes dos PBMCs, como foi reportado por Yu *et al.*, em 2002. É conhecido que a IgA (imunoglobulina A) anti-HPV está correlacionada com o *clearance* viral (Burd, 2003). Uma vez que os linfócitos B podem estar sendo alterados devido à infecção pelo TTV, o *clearance* viral pode não estar sendo realizado pelas IgA HPV-específicas.

Na resposta imune celular, a resposta imune primária para o *clearance* do HPV envolve células apresentadoras de antígeno, linfócitos T CD4, CD8 e citocinas co-estimulatórias. Em mulheres imunossuprimidas, a incidência da infecção pelo HPV e progressão para o câncer invasivo está aumentada (Arends *et al.*, 1997).

Em relação à perda dos mecanismos de controle celular, o papel de leucócitos antígeno-específico contra tumor tem sido considerado fator decisivo na patogênese do câncer cervical (O'Brien *et al.*, 2001; Evans *et al.*, 1997). Estudos relacionados à investigação de células imunológicas em neoplasias intraepiteliais cervicais avançadas demonstraram uma diminuição significativa nos macrófagos intraepiteliais (Tay *et al.*, 1987), células de Langerhans (Spinillo *et al.*, 1993) e linfócitos T citotóxicos (Evans *et al.*, 1997).

É conhecido que citocinas têm potencial em estimular ativação de células T, contudo o padrão de ativação pode distinguir para diferentes interações de citocinas-receptores citocinas (Nanki & Lipsky, 2001).

Genes da resposta imune têm sido relacionados com a patogênese do câncer cervical (Ghaderi M. *et al.*, 2000). Dentre os produtos de genes envolvidos no recrutamento de macrófagos para a mucosa cervical, citocinas e a expressão de seus receptores tem demonstrado provável função na imunidade contra o tumor cervical (Ghaderi M. *et al.*, 2000; Kleine-Lowinski K. *et al.*, 1999; Ohta M. *et al.*, 2002). Uma vez que citocinas, quimiocinas e radicais livres iniciam e perpetuam a resposta inflamatória, genes polimórficos ou variações

genéticas em genes relacionados à imunidade podem estar envolvidos com a persistência e progressão do câncer (Moss e Blaser, 2005).

CCR5 desempenha um importante papel no recrutamento de macrófagos, monócitos, e células T na inflamação (Panzer *et al.*, 2005; Spagnolo *et al.*, 2005) levando a uma resposta imune envolvida no padrão de citocinas Th1 (Loetscher *et al.*, 1998).

Recentes estudos têm demonstrado o envolvimento do CCR5 em várias doenças humanas, abrangendo desde doenças infecciosas e inflamatórias até câncer (Balistreri *et al.*, 2007). Em 2006, Vaday *et al.* sugeriram que a patogênese do câncer de próstata é influenciada pela inflamação, especialmente por citocinas inflamatórias tais como ligante do CCR5 (CCL5). Zheng *et al.* (2006) relataram que a deleção de 32 pares de bases no gene do receptor de quimiocina 5 está discretamente associada com um aumento do risco de infecção por HPV.

Neste trabalho, diferentes genótipos de CCR5 foram analisadas (Figura 9), bem como sua relação com infecção de HPV e TTV. Observou-se que o polimorfismo do gene CCR5 não está associado com aumento do risco de infecção por HPV (Figura 10); no entanto em pacientes sugestivos para HPV, houve uma maior incidência de TTV em pacientes com câncer e genótipo selvagem para CCR5 (50%) (Figura 11).

Clinicamente, a infecção por HIV está associada com aumento da incidência e persistência da infecção por HPV, que por sua vez está associada com aumento na lesão intraepitelial de alto grau e câncer cervical invasivo (Vermud *et al.*, 1991; Sun *et al.*, 1997). Embora neste trabalho, cinco pacientes com HPV apresentaram coinfeção com HIV e genótipo selvagem para o gene CCR5, nenhum deles desenvolveu câncer e apenas um paciente apresentava infecção por TTV.

Não está bem estabelecido qual o primeiro local de infecção no trato genital feminino pelo HIV-1+. Pudney *et al.* (2005) sugerem ser a cérvix o primeiro local de infecção por este vírus, e inflamação neste local aumenta o risco de transmissão do HIV, uma vez que cervicites e vaginites aumentam o número de linfócitos CD8+ e CD4+ intraepiteliais e também de APCs.

7 CONCLUSÃO

Neste estudo, o TTV foi mais prevalente em pacientes sugestivos para HPV com câncer cervical e o polimorfismo do gene para o receptor de quimiocina 5 não influencia na evolução dessa doença. É possível que este vírus seja um fator de risco no desenvolvimento de câncer nos pacientes com colpocitologia oncótica sugestiva de infecção por HPV.

REFERÊNCIAS

Abraham P. TT viruses: how much do we know? *The Ind J Med Res.* 2005;122: 7-10.

Allan G.M., McNeilly F., Foster J.C., Adair B.M. Infection of leucocyte cell cultures derived from different species with pig circovirus. *Vet Microbiol.* 1994; 41: 267-279.

Anzala A.O., Ball T.B., Rostron T., O'Brien S.J, Plummer F.A., Rowland-Jones S.L. CCR2-64I allele and genotype association with delayed AIDS progression in African women. University of Nairobi Collaboration for HIV Research. *Lancet.*1998; 351:1632-1633.

Arends M.J., Benton E.C., McLaren K.M., Stark L.A., Hunter J.A., Bird C.C. Renal allograft recipients with high susceptibility to cutaneous malignancy have an increased prevalence of human papillomavirus DNA in skin tumours and a greater risk of anogenital malignancy. *Br J Cancer.* 1997; 75:722-728.

Baggiolini, M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature.* 1998; 392:565-568.

Baggiolini, M. Chemokines in pathology and medicine. *J Interl Med.* 2001; 250:91-104.

Baggiolini M., Dewald B., Moser B. Human chemokines: an update. *An Rev Immunol.*1997; 15:675-705.

Baggiolini M., Dewald B., Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines- CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* 1994; 55:97-179.

Baldwin E.T., Weber I.T., St Charles R., Xuan J.C., Appella E., Yamada M., Matsushima K., Edwards B.F., Clore G.M., Gronenborn A.M. Crystal structure of interleukin 8: symbiosis of NMR and crystallography. *Proc Natl Acad Sci USA.*1991; 88:502-6.

Balistreri CR, Caruso C, Grimaldi MP, Listi F, Vasto S, Orlando V, Campagna AM, Lio D, Candore G. CCR5 receptor: biologic and genetic implications in age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1100:162-72.

Barril G., López-Alcorocho J.M., Bajo A., Ortiz-Movilla N., Sánchez-Tomero J.A., Bartolomé J., Selgas R., Carreño V. Prevalence of TT virus in serum and peripheral mononuclear cells from a CAPD population. *Perit Dial Intern.* 2000 20:65-68.

Baseman, J.G. & Koustsky L.A. The Epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol.* 2005, 32 Suppl 1, s16-24.

Becker T.M., Wheeler C.M., McGough N.S., Jordan S.W., Dorin M., Miller J. Cervical papillomavirus infection and cervical dysplasia in Hispanic, Native American, and non-Hispanic white women in New Mexico. *Amer J Public Heal.* 1991;81:582-586.

Bendinelli M., Pistello M., Maggi F., Fornai C., Freer G., Vatteroni M.L. Molecular Properties, Biology, and Clinical Implications of TT Virus a Recently Identified Widespread Infectious Agent of Humans. *Clin Microb Rev.* 2001; 98-113.

Bernard P. & Couturier M. Cell Killing by the F Plasmid CcdB Protein Involves Poisoning of DNA-Topoisomerase II Complexes. *J Mol Biol.* 1992; 226:735-745.

Bernard P. Gabant P., Bahassi E.M. Couturier M. Positive Selection Vectors Using the F Plasmid ccdB Killer Gene. *Gene.* 1994; 148: 71-74.

Bernard P., Kezdy K., Melderer L.V., Steyaert J., Wyns L. Pato M.L., Higgins P.N., Couturier M. The F Plasmid CcdB Protein Induces Efficient ATP-dependent DNA Cleavage by Gyrase. *J Mol Biol.* 1993; 234: 534-541.

Berns KI. Parvovirus replication. *Microbiol Rev.* 1990; 54:316-329.

Burd E.M. Human Papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16:1-17.

Camci C., Guney C., Balkan A., Buyukberber N., Buyukberber S., Kadayifci A., Kubar A. The prevalence of TT virus in cancer patients. *New Microbiol.* 2002; 25: 463-468.

Chan P.K.S., Tam W.H., Yeo W., Cheung J.L.K., Zhong S., Cheng A.F. High carriage rate of TT virus in the cervixes of pregnant women. *Clin Infect Dis.* 2001; 32:1376-1377.

Chang H.Y., Ahn S.H., Kim Do Y., Shin J.S., Kim Y.S., Hong S.P., Chung H.J., Kim S.O., Yoo W.D., Han K.H. Association between CCR5 Promoter Polymorphisms and Hepatitis B Virus Infection. *Korean J Hepatol.* 2005; 11:116-24.

Chies J.A., Hutz M.H. High frequency of the CCR5delta32 variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia. *Braz J Med Biol Res.* 2003; 36:71-5.

Clark-Lewis I., Schumacher C., Baggiolini M., Moser B. Structure-activity relationships of interleukin-8 determined using chemically synthesized analogs: critical role of NH₂-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities. *J. Biol. Chem.* 1991; 266:23128-23134.

Clark-Lewis I., Dewald B., Geiser T., Moser B., Baggiolini M. Platelet factor 4 binds to interleukin 8 receptors and activates neutrophils when its N terminus is modified with Glu-Leu-Arg. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90:3574-7.

Clark-Lewis I., Kim K.S., Rajarathnam K., Gong J.H., Dewald B., Moser B., Baggiolini M., Sykes B.D. Structure activity relationships of chemokines. *J Leuk Biol.* 1995; 57:703-11.

Clore G.M., Appella E., Yamada M., Matsushima K., Gronenborn A.M. Three-dimensional structure of interleukin 8 in solution. *Biochemistry.* 1990; 29:1689-961.

Cohen M.S., Anderson D.J. Genitourinary mucosal defenses. In: Holmes KK, Sparling TF, Mardh PA, Lemoy SM, (eds), *Sexually Transmitted Diseases*. New York: McGraw-Hill. 1999:173-190.

Connor J.P., Ferrer K., Kane J.P., Goldberg J.M. Evaluation of Langerhans cells in the cervical epithelium of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol.* 1999; 75:130.

Crump M.P., Gong J.H., Loetscher P., Rajarathnam K., Amara A., Arenzana-Seisdedos F., Virilizier J.L., Baggiolini M., Sykes B.D., Clark-Lewis I. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor 1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO Journal.* 1997; 16:6996-7007.

De Sanjose S., Hamsikova E., Munoz N., Bosch F.X., Hofmannova V., Gili M., Izarzugaza I., Viladiu P., Tormo M.J., Moreo P., Munoz M.T., Ascunce N., Tfur L., Shah K.V., Vonka V. Serological response to HPV16 in CIN-III and cervical cancer patients. Case-control studies in Spain and Colombia. *Int J Cancer.* 1996; 66:70-74.

de Villiers E.M., Papillomavirus and HPV typing. *Clinics in Dermatology.* 1997; 15:199-206.

de Villiers E.M., Wagner D., Schneider A., Wesch H., Munz F., Miklaw H., zur Hausen H. Human papillomavirus DNA in women without and with cytological abnormalities: results of a 5-year follow-up study. *GynOnc.* 1992; 44:33-39.

Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttey, G.A., Smith, M.S., Allikmets, R., Goedert, J.J., Buchbinder, S.P., Vittinghoff, E., Gomperts, E., Donfield, S., Vlahov, D., Kaslow, R.,

Saah, A., Rinaldo, C., Detels, R., O'Brien, S.J. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by deletion of the CCR5 structural gene: Hemophilia Growth and Development Study Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science*. 1996; 273:1856-1862.

DiSaia P.J., C.W. *Clinical gynecologic oncology*, 1997, St Louis: Mosby.

Evans E.M., Man S., Evans A.S., Borysiewicz L.K. Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Can Res*. 1997; 57:2943-2950.

Ferlay J., Bray F., Pisani P., Parkin D.M. *GLOBOCAN 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, Version 1.0*. Lyon: IARC Press; 2001 (IARC Cancer Base N°5).

Figueiredo C.P., Franz-Vasconcelos H.C.F., Di Giunta G., Mazzuco T.L., Caon T., Fernandes A.L.M., Simões C.M.O., Antunes V.L.S., Niel C., Barardi C.R.M. Detection of Torque teno virus in Epstein-Barr virus positive and negative lymph nodes of patients with Hodgkin lymphoma. *Leuk & Lym*. 2007; 48: 731-735.

Ghaderi M., Nikitina L., Peacock C.S., Hjelmstrom P., Hallmans G., Wiklund F *et al* . Tumor necrosis factor α -11 and DR15-DQ6 (B*0602) haplotype increases the risk for cervical intraepithelial neoplasia in human papillomavirus 16 seropositive women in Northern Sweden. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000; 9:1067-1070.

Gonçalves MAG, Soares EG, Fernandes APM, *et al*. Langerhans cells count and HLA class II profile in cervical intraepithelial neoplasia in the presence or absence of HIV infection. *Eur J Obstet Gynecol Repr Biol*. 2004; 114: 221.

Hébert, C.A.; Vitangcol, R.V.; Baker, J.B. Scanning mutagenesis of interleukin-8 identifies a cluster of residues required for receptor binding. *J Biol Chem*. 1991; 266:18989-94.

Hijikata M, Takahashi K, Mishiro S. Complete circular DNA genome of a TT virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. *Viro*. 1999; 260:17-22.

http://www.aegis.com/pubs/cdc_eid/1997/EID3302-Fig1.gif

<http://www.cicc.com.br/miniatlas.asp> acesso 28/08/07

http://www.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr4topo_map.pdf acesso 23/07/07

<http://www.msnbc.msn.com/id/12333785/site/newsweek/page/0/> acesso 27/09/2007

http://www.who.int/hpvcentre/statistics/statistics_map_ICO.pdf

<http://www.who.int/reproductive-health/publications/hpvvaccines/text.pdf>

Hu Y.W., Al-Moslih M.I., Ali M.T.A, Khameneh S.R., Perkins H., Diaz-Mitoma F., Roy J.N., Uzicanin S., Brow E.G. Molecular detection method for all known genotypes of TT virus (TTV) and TTV-like viruses in thalassemia patients and healthy individuals. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 3747-54.

Itoh K, Takahashi M, Ukita M, Nishizawa T, Okamoto H. Influence of primers on the detection of TTV virus DNA by polymerase chain reaction. *J Infect Dis.* 1999; 180:1750-1.

Johansson M, Lycke NY. Immunology of the human genital tract. *Curr Opin Infect Dis.* 2003; 16:43-49.

Kanda Y, Tanaka Y, Kami M, Saito T, Asai T, Izutsu K, Yuji K, Ogawa S, Honda H, Mitani K, Chiba S, Yazaki Y, Hirai H. TT virus in bone marrow transplant recipients. *Blood.* 1999; 93:2485-2490.

Kato T, Mizokami M, Mukaide M, Orito E, Ohno T, Nakano T, Tanaka Y, Kato H, Sugauchi F, Ueda R, Hirashima N, Shimamatsu K, Kage M, Kojiro M. Development of a TT virus DNA quantification system using real-time detection PCR. *J Clin Microbiol.* 2000 38:94-98.

Kato T, Mizokami M, Nakano T, Orito E, Ohba K, Kondo Y, Tanaka Y, Ueda R, Mukaide M, Fujita K, Yasuda K, Iino S. Heterogeneity in E2 region of GBV-C/hepatitis G virus and hepatitis C virus. *J Med Virol.* 1998; 55:109-117.

Khudyakov YE, Cong ME, Nichols B, Reed D, Dou XG, Viazov SO, Chang J, Fried MW, Williams I, Bower W, Lambert S, Purdy M, Roggendorf M, Fields HA. Sequence heterogeneity of TT virus and closely related viruses. *J Virol.* 2000:2990-3000.

Kim, K.S.; Rajarathnam, K.; Clark-Lewis, I.; Sykes, B.D. Structural characterization of a monomeric chemokine: monocyte chemoattractant protein-3. *FEBS Lett.* 1996; 395:277-282.

Kirby, L.T. DNA fingerprinting: An introduction. Stocton Press. New York, NY. 1990.

Kiviat N.B. & Koutsky L.A., Specific human papillomavirus type as the causal agents of most cervical intraepithelial neoplasia: implications for current views and treatment. *The J Nat Can Inst.* 1993; 85: 934-935.

Kleine-Lowinski K., Gillitzer R., Kuhne-Heid R. And Rosl F. Monocyte-chemo-attractant-protein-1 (MCP-1)-gene expression in cervical intra-epithelial neoplasias and cervical carcinomas. *Int. J. Cancer* 1999; 82: 6-11.

Klingman D., Hilt DC. The S-100 protein family. *Trends Biochem Sci.* 1998; 13:4327.

Kooistra K., Zhang Y.H., Henriquez N.V., Weiss B., Mumberg D., Noteborn M.H.M. TT virus-derived apoptosis preferentially in hepatocellular carcinoma-derived cells. *J Gen Vir.* 2004; 85: 1445-1450.

Leboute, A.P.; De Carvalho, M.W.; Simoes, A.L. Absence of the deltaCCR5 mutation in indigenous populations of the Brazilian Amazon. *Hum Genet.* 1999; 105:442-443.

Lehtinen M., Dillner J., Knekt P., Luostarinen T., Aromaa A., Kimbauer R., Koskela P., Paavonen J., Peto R., Schiller J.T., Hakama M. Serologically diagnosed infection with human papillomavirus type 16 and risk for subsequent development of cervical carcinoma nested case-control study. *Brit Med J.* 1996; 312: 537-539.

Lenski, R.E. Evolution of plague virulence. *Nature.* 1988; 334, 473.

Libert, F.; Cochaux, P.; Bechman, G.; Samson, M.; Aksenova, M.; Cao, A.; Czeizel, A.; Claustres, M.; De La Rua, C.; Ferrari, M. The delta CCR5 mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe. *Hum Mol Gen.* 1998; 7, 399.

Liu R., Paxton, W.A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S.R., Horuk, R., Macdonald, M.E., Stuhlmann, H., Koup, R.A., Landau, N.R. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell.* 1996; 86:367-377.

Lodi, P. J., Garrett, D.S., Kuszewski, J., Tsang, M.L., Weatherbee, J.A., Leonard, W.J., Gronenborn, A.M., Clore, G.M. High-resolution solution structure of the beta chemokine MIP-1 (beta) by multidimensional NMR. *Science.* 1994; 263:1762-1767.

Loetscher P, et al. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 1998; 391: 344.

Lowy D.R., Kirnbauer R., Schiller J.T. Genital Human papillomavirus infection. *Nat Ac Sciences*. 1994; 91: 2436-2440.

Maggi F., Fornai C., Zaccaro L., Morrica A., Vatteroni M.L., Isola P., Marchi S., Ricchiuti A., Pistello M., Bendinelli M. TT Virus (TTV) Loads associated with different peripheral blood cell types and evidence for TTV replication in activated Mononuclear Cells. *J Med Vir*. 2001; 64:190-194.

Maggi F., Pifferi M., Tempestini E., Fornai C., Lanini L., Andreoli E., Vatteroni M., Presciuttini S., Pietrobelli A., Boner A., Pistello M., Bendinelli M. TT virus loads and lymphocyte subpopulations in children with acute respiratory diseases. *J Virol*. 2003; 77:9081-9083.

Mariscal F., López-alcorocho J.M., Rodriguez-Inigo E., Ortiz-Movilla N., de Lucas S., Bartolomé J., Crreno V. TT virus replicates in stimulated but not in nonstimulated peripheral blood mononuclear cells. *Vir*. 2002; 301:121-129.

Martinson, J.J.; Chapman, N.H.; Rees, D.C.; Liu, Y.T.; Clegg, J.B. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat. Genet*. 1997; 16:100-103.

Martinson, J.J.; Hong, L.; Karanicolas, R.; Moore, J.P.; Kostrikis, L.G. Global distribution of the CCR2-64I/CCR5-59653T HIV-1 disease-protective haplotype. *AIDS*. 2000; 14:483-489.

McNicholl, J.M.; Smith, D.K.; Qari, S.H.; Hodge, T. Host genes and HIV: the role of the chemokine receptor gene CCR5 and its allele. *Emerg Infect Dis*. 1997; 3:261-271.

Mikano H., Sato Y., Hayasaki Y., Kawazoe K., Izumi K., Ito K., Yamada Y., Tamaya T. Intravaginal bacterial flora in patients with uterine cervical uterine. High incidence of detection of *Gardnerella vaginalis*. *J Infect Chemother*. 1999; 5:82-85.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16:1215.

Miyata H, Tsunoda H, Kazi A, Yamada A, Khan MA, Murakami J, Kamahora T, Shiraki K, Hino S. Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. *J Virol*. 1999; 73:3582-3586.

Morrica A, Maggi F, Vatteroni ML, Fornai C, Pistello M, Ciccorossi P, Grassi E, Gennazzani A, Bendinelli M. TT virus: evidence for transplacental transmission. *J Infect Dis*. 2000; 181:803-804.

Moss SF, Blaser MJ. Mechanisms of disease: Inflammation and the origins of cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2005; 2:90-97.

Munger K., Baldwin A., Edwards K.M., Hayakawa H., Nguyen C.L., Owens M., Grace M., Huh K. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol.* 2004; 78:11451-11460.

Munoz N., Bosch F.X., de Sanjose S., Herrero R., Castellsague X., Shah KV., Snijeders P.J., Meijers C.J., Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The N Engl J Med.* 2003; 348: 518-527.

Murphy, P.M. The molecular biology of leucocyte chemoattractant receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 1994; 12:593-633.

Murphy, P.M.; Baggiolini, M.; Charo, I.F.; Hebert, C.A.; Horuk, R.; Matsushima, K.; Miller, L.H.; Oppenheim, J.J.; Power, C.A. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev.* 2000; 52:145-76.

Mushahwar IK, Erker JC, Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, Birkenmeyer LG, Chalmers ML, Pilot-Matias TJ, Dexai SM. Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96:3177-3182.

Mushahwar IK. Recently discovered blood-borne viruses: are they hepatitis viruses or merely endosymbionts? *J Med Virol.* 2000; 62:399-404.

Nanki T, Lipsky PE. Stimulation of T-cell activation by CXCL12/SDF-1 involves a G-protein mediated signaling pathway. *Cell Immunol.* 2001; 214: 145.

Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in post transfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Comm.* 1997; 241: 92-97.

O'Brien P.M., Tsirimonaki E., Coomber D.W., Millan D.W., Davis J.A., Campo M.S. Immunoglobulin genes expressed by B-lymphocytes infiltrating cervical carcinomas show evidence of antigen-driven selection. *Canc Immunol Immunother.* 2001; 50:523-532.

O'Brien, S.J.; Moore, J.P. The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. *Immunol Rev.* 2000; 177:99-111.

Ohta M., Kitadai Y., Tanaka S., Yoshihara M., Yasui W., Mukaida N. *et al*: Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int. J. Cancer*. 2002; 102: 220-224.

Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, Ukita M, Ikeda H, Iizuka H, Miyakawa Y, Mayumi M. Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatology*. 1998b; 10:1-16.

Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions. *Virology*. 1999 259:428-436.

Okamoto H., Akahane Y., Ukita M., Fukuda M., Tsuda F., Miyakawa Y., Mayumi M., Fecal excretion of nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non A-G hepatitis. *J Med Vir*. 1998a; 56:128-132.

Okamoto H., Nishizawa T., Tawara A., Takahashi M., Kishimoto J., Sai T., Sugai Y. TT virus mRNAs detected in the bone marrow cells from an infected individual. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000a; 279:700-707.

Okamoto H., Takahashi M., Nishizawa T., Tawara A., Replicative forms of TT virus DNA in bone marrow cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000b; 270:657-662.

Ott C, Duret L, Chemin I, Trepo C, Mandrand B, Komurian-Pradel F. Use of a TT virus ORF1 recombinant protein to detect anti-TT virus antibodies in human sera. *J Gen Virol*. 2000 81(Pt 12):2949-58.

Panzer U, *et al*. The chemokines receptor 5 Delta32 mutation is associated with increased renal survival in patients with IgA nephropathy. *Kidney Int* 2005; 67: 75-81.

Peng Y.H., Nishizawa T., Takahashi M., Ishikawa T., Yoshikawa A., Okamoto H. Analysis of the entire genomes of thirteen TT virus variants classifiable into the fourth and fifth genetic groups, isolated from viremic infants. *Arch Virol*. 2002; 147:21-41.

Poser, C.M. The dissemination of multiple sclerosis a Viking saga. A historical essay. *Annals of Neurology*. 1994; 36, 231.
Prescrire Int. 2007 Jun; 16(89):115-119.

Proost, P.; Wuyts, A.; Van Damme, J. The role of chemokines in inflammation. *Int J Clin Lab Res.* 1996; 26:211-23.

Pudney J., Quayle A.J., Anderson D.J., Immunological Microenvironments in Human Vagina and Cervix: Mediators of Cellular Immunity are Concentrated in the Cervical Transformation zone. *Biol Reprod.* 2005; 1253-1263.

Richart, R.M. (1990) A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet. Gynecol.* 1990; 75: 131-133.

Richart R.M., Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Pathology Annual.* 1973; 8:301-328.

Robbins S.L., Cotran R.S., Kumar V., Abbas A.K., Fausto N., *Patologia – Bases Patológicas das Doenças*, 2005, editora Elsevier, 7ª edição, Rio de Janeiro, 1592 páginas.

Rodriguez-Inigo E., Casqueiro M., Bartolome J., Ortiz-Movilla N., Lopez-Acorocho J.M., Herrero M., Manzarbeitia F., Oliva H., Carreno V. Detection of TT virus DNA in liver biopsies by in situ hybridization. *Am J Path.* 2000; 156:1227-1234.

Samson, M., Libert, F., Doranz, B.J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C.M., Saragosti, S., Lapomeroukie, C., Cognaux, J., Forceille, C., Muyldermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R.J., Collman, R.G., Doms, R.W., Vassart, G., Parmentier, M.. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature.* 1996; 332:722-725.

Schafer BW, Heizmann CW. The S-100 protein family of EF-hand-calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci.* 1996; 21:139.

Schiffman M., Castle P.E., Jeronimo J., Rodriguez A., Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 2007; 370:890-907.

Schiffman M.H. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Nat Canc Inst.* 1992; 84:394-398.

Sidoti A.; D'Angelo, R.; Rinaldi, C.; De Luca, G.; Pino, F.; Salpietro, C.; Giunta, D.E.; Saltalamacchia, F.; Amato, A. Distribution of the mutated delta32 allele of the CCR5 gene in a Sicilian population. *Int J Immunogenet.* 2005; 32:193-198.

Simmonds P, Davidson F, Lycett C, Prescott LE, MacDonald DM, Ellender J, Yap PL, Ludlam CA, Haydon GH, Gillon J, Jarvis LM. Detection of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood products. *Lancet.* 1998; 352(9137):1394.

Sinal S.H. & Woods C.R. Human Papillomavirus infections of the genital and respiratory tracts in young children. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2005; 16:306-316.

Smith J.S., Lindsay L., Hoots B. et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer.* 2007; 121: 621-632.

Smith M.W.; Dean, M.; Carrington, M.; Winkler, C.; Huttley, G.A.; Lomb, D.A.; Goedert, J.J.; O'Brien, T.R. Contrasting influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV infection and disease progression. *Science.* 1997; 277:959-965.

Solomon D., Davey D., Kurman R., Moriarty A., O'Connor D., Prey M., Raab S., Sherman M., Wilbur D., Wright T., Jr & Young N., The 2001 Bethesda System: terminology for reporting of cervical cytology. *JAMA.* 2002; 287: 2114-2119.

Spagnolo P, *et al.* C-C chemokines receptor 5 gene variants in relation to lung disease in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 172: 721-728.

Spinillo A., Tenti P., Zappatore R., De Seta F., Silini E., Guaschino S. Langerhan's cell counts and cervical intraepithelial neoplasia in women with human immunodeficiency virus infection. *Gynecol Oncol.* 1993; 48: 210-213.

Stephens, J.C.; Reich, D.E.; Goldstein, D.B.; Shin, H.D.; Smith, M.W.; Carrington, M.; Winkler, C.; Huttley, G.A.; Allikmets, R.; Schriml, L.; Gerrard, B.; Malasky, M.; Ramos, M.D.; Morlot, S.; Tzetis, M.; Oddoux, C.; Di Giovine, F.S.; Nasioulas, G.; Chandler, D.; Aseev, M.; Hanson, M.; Kalaydjieva, L.; Glavac, D.; Gasparini, P.; Kanavakis, E.; Claustres, M.; Kambouris, M.; Ostrer, H.; Duff, G.; Baranov, V.; Sibul, H.; Metspalu, A.; Goldman, D.; Martin, N.; Duffy D.; Schmidtke, J.; Estivill, X.; O'Brien, S.J.; Dean, M. Dating the origin of the CCR5-Delta32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes. *Am J Hum Genet.* 1998; 62:1507-1515.

Sun XW, Kuhn L, Ellerbrock TV, Chaisson MA, Bush TJ, Wright TC. Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med.* 1997; 337:1343.

Szládek G, Juhász A, Kardos G, Szoke K, Major T, Sziklai I, Tar T, Márton I, Kónya J, Gergely L, Szarka K. High co-prevalence of genogroup 1 TT virus and human papillomavirus is associated with poor clinical outcome of laryngeal carcinoma. *J. Clin. Pathol.* 2005; 58:402-405.

Takahashi K, Hijikata M, Samokhvalov EI, Mishiro S. Full or near-full length nucleotide sequences of TT virus variants (types SANBAN and YONBAN) and the TTV-like mini virus. *Intervirology*. 2000 43:119–123.

Taube J.M., Nichols A.D., Bornman L.S., Bornman D.M., Jackson J.B. Langerhans cell density and high-grade vulvar intraepithelial neoplasia in women with human immunodeficiency virus infection. *J Cuta Pathol*. 2007; 34:565-570.

Tay S.K., Jenkins D., Maddox P, Campion M., Singer A. Subpopulation of Langerhans cells in cervical neoplasia. *Br J Obstet Gynaecol*. 1987a; 94:10.

Tay S.K., Jenkins D., Maddox P., Hogg N., Singer A. Tissue macrophage response in human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Obstet Gynaecol*. 1987b; 94:1094-1097.

Thom K & Petrik J. Progression towards AIDS leads to increased torque teno virus and torque teno minivirus titers in tissues of HIV infected individuals. *J. Med. Virol*. 2007; 79:1-7.

Todd D., Creelan J.L., Mackie D.P., Rixon F., MacNulty M.S. Purification and biochemical characterization of chicken anaemia agent. *J Gen Virol*. 1990; 71: 819-823.

Ukita M., Okamoto H., Kato N., Miyakawa Y., Mayumi M., Excretion into bile of a novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non A-G hepatitis. *J Infec Dis*. 1999;179:1245-1248.

Vaday GG, Peehl DM, Kadam PA, Lawrence DM. Expression of CCL5 (RANTES) and CCR5 in prostate cancer. *Prostate*. 2006; 66:124-134.

Vermud SH, Kelly KF, Klein RS, et al. High risk of human papillomavirus infection and cervical squamous intraepithelial lesions among women with symptomatic human immunodeficiency virus infection. *Amer J Obstr and Gynec*. 1991; 165:392.

Wang, F.S.; Hong, W.G.; Cao, Y.; Liu, M.X.; Jin, L.; Hu, L.P.; Wang, Z.; Feng, T.J.; Hou, J.; Zhang, B.; Shi M.; Xu, D.P.; Lei, Z.Y.; Wang, B.; Liu, Z.D.; Ye, J.J.; Peng, L.; Qiu, Y.; Winkler, C. Population survey of CCR5 delta32, CCR5 m303, CCR2b 64I, and SDF1 3'A allele frequencies in indigenous Chinese healthy individuals, and in HIV-1-infected and HIV-1-uninfected individuals in HIV-1 risk groups. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003; 32:124-30.

World Health Organization, Human Papillomavirus and HPV vaccines: Technical information for policy-makers and health professionals. 2007.

Yang, X.; Ahmad, T.; Gogus, F.; Verity, D.; Wallace, G.R.; Madanat, W.; Kanawati, C.A.; Stanford, M.R.; Fortune, F.; Jevell, D.P.; Marshall, S.E. Analysis of the CC chemokine receptor (CCR5) Delta32 polymorphism in Behcet's disease. *Eur J Immunogenet.* 2004; 31:11-14.

Yu Q., Shiramizu B., Nerurkar V.R., Hu N., Shikuma C.M., Melish M.E., Cascio L., Imrie A., Lu Y., Yanagihara R. TT virus: Preferential distribution in CD19+ peripheral blood mononuclear cells and lack of viral integration. *J Med Vir.* 2002; 66:276-284.

Zheng B., Wiklund F., Gharizadeh B., Sadat M., Gambelunghe G., Hallmans G., Dillner J., Wallin K., Genetic polymorphism of Chemokines receptors CCR2 and CCR5 in Swedish cervical cancer patients. *Anticancer Res.* 2006; 26:3669-3674.

Zhong S, Yeo W, Tang M, Liu C, Lin X-R, Ho WM, *et al.* Frequent detection of the replicative forms of TT virus DNA in peripheral blood mononuclear cells and bone marrow cells in cancer patients. *J Med Virol.* 2002; 66:428-34.

Zimmerman, P.A.; Buckler-White, A.; Alkhatib, G.; Spalding, T.; Kubofcik, J.; Combadiere, C.; Weissman, D.; Cohen, O.; Rubbert, A.; Lam, G.; Vaccarezza, M.; Kennedy, P.E.; Kumaraswami, V.; Giorgi, J.V.; Detels, R.; Huner, J.; Chopek, M.; Berger, E.A.; Fauci, A.S.; Nutman, T.B.; Murphy, P.M. Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5; Studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk. *Mol. Med.* 1997; 3:23-36.

Zlotnik, A.; Yoshie, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 2000; 12:121-127.

Zuniga, J.A.; Villarreal-Garza, C.; Quiroz-Morales, V.; Flores, E.; Vargas-Alarcón, G.; Granados, J.; Reyes-Terán, G. Biological relevance of the polymorphism in the CCR5 gene in diseased and healthy Mexican individuals. *Clin Exp Rheumatol.* 2003; 21:351-354.

ANEXOS

ANEXO I – COLORAÇÃO DE PAPANICOLAOU

As lâminas com as amostras foram mergulhadas em álcool absoluto por um período mínimo de 12 horas e, a seguir, realizada a coloração de Papanicolaou: dez mergulhos em soluções de álcool etílico 95%, 80%, 70% e 50%; mergulhou-se no corante Hematoxilina de Harris por um minuto; colocou-se em água corrente para retirar o excesso de corante, em seguida mergulhou-se em solução de álcool etílico 7%/0,5% ácido clorídrico, e em seguida mergulhou-se em água corrente por 10 minutos. Na seqüência, foram realizados dez mergulhos em soluções de álcool etílico 50%, 70%, 80%, 95% e deixou-se por 10 segundos no corante Orange G; retirou-se e mergulhou-se dez vezes em solução alcoólica 95% por duas vezes. Colocou-se no corante EA36/31 por um minuto, e em seguida fez-se dez mergulhos em três cubas com álcool absoluto; terminou-se com dez mergulhos em três cubas de xilol. Deixou-se secar espontaneamente e, então, foi aplicada uma leve camada de verniz ou esmalte incolor.

1 ANEXO II

2

3 ANÁLISE DA MICROBIOTA CÉRVICO-VAGINAL

4 A análise da microbiota cérvico-vaginal foi realizada pela Bacterioscopia ao Gram e
5 exame a fresco.

6 No exame a fresco, o swab contendo material vaginal foi acondicionado num frasco
7 com solução fisiológica estéril 0,85% e uma gota deste foi depositada numa lâmina e coberto
8 com lamínula. A preparação foi visualizada em microscópio de campo claro em objetiva de
9 40X, no qual pesquisou-se a presença de *Trichomonas vaginalis*, leveduras e de células alvo.

10 Para bacterioscopia ao Gram a leitura da lâmina foi realizado no microscópio com
11 objetiva de 1000X, utilizando-se óleo de imersão. As estruturas visualizadas foram
12 quantificadas de 1 a 4+ (Tabela 1), tendo sido avaliada a redução de lactobacilos e o
13 predomínio de cocos Gram variável tipo *Gardnerella vaginalis*, bacilos curvos tipo
14 *Mobiluncus* spp. e bacilos Gram negativo pequenos tipo *Prevotella* spp. e *Porphyromonas*
15 spp.

16 Para cada morfotipo foi verificado o valor correspondente na tabela 1. O escore
17 individual para os 4 morfotipos foram somados e um escore total foi dado para interpretação:
18 negativo para vaginose bacteriana (0-3), vaginose indeterminada (4-6) e vaginose bacteriana
19 (7-10).

20

21 Tabela 1. Critérios Laboratoriais de Nugent: Avaliação da flora vaginal pela coloração de
22 Gram.

23

Morfotipos ao Gram	m.o/ campo 1000x	Score
Lactobacillus	Superior a 30	0
	De 5 a 30	1
	De 1 a 4	2

	Inferior a 1	3
	Ausência	4
Mobiluncus	Superior a 5	2
	Inferior a 1 até 4	1
	Ausência	0
	Superior a 30	4
Gardnerella vaginalis	De 5 a 30	3
Ou	De 1 a 4	2
Bacteroides	Inferior a 1	1
	Ausência	0

- 1 Interpretação:
 2 Score de 0 a 3: secreções vaginais normais.
 3 Score de 4 a 6: vaginose indeterminada.
 4 Score superior ou igual a 7: vaginose bacteriana.

5

6

1 ANEXO III

2 CARACTERÍSTICAS DO VETOR pCR[®]4-TOPO[®]

Comments for pCR[®]4-TOPO[®] 3956 nucleotides

lac promoter region: bases 2-216

CAP binding site: bases 95-132

RNA polymerase binding site: bases 133-178

Lac repressor binding site: bases 179-199

Start of transcription: base 179

M13 Reverse priming site: bases 205-221

LacZ α -*ccdB* gene fusion: bases 217-810

LacZ α portion of fusion: bases 217-497

ccdB portion of fusion: bases 508-810

T3 priming site: bases 243-262

TOPO[®] Cloning site: bases 294-295

T7 priming site: bases 328-347

M13 Forward (-20) priming site: bases 355-370

Kanamycin promoter: bases 1021-1070

Kanamycin resistance gene: bases 1159-1953

Ampicillin (*b/a*) resistance gene: bases 2203-3063 (c)

Ampicillin (*b/a*) promoter: bases 3064-3160 (c)

pUC origin: bases 3161-3834

(c) = complementary strand

3

4

5

6

7

8

9

10

1 **ANEXO IV**

2 **ARTIGO 1**

3 **TÍTULO: Torque Teno Virus (TTV) in patients suggestive for human papillomavirus:**
4 **investigating its association with cervical carcinoma.**

5

6 **ABSTRACT**

7 *Purpose* The aim of the present study was to investigate Torque Teno Virus (TTV) presence
8 in human papillomavirus (HPV) suggestive women and in controls, in order to elucidate any
9 possible influence on cancer development.

10 *Methods* In the present study, TTV was investigated in the peripheral blood of 117 Brazilian
11 women by nested Polymerase Chain Reaction (PCR), using a set of primers located in the N22
12 region of the large Open Reading Frame 1 (ORF-1).

13 *Results* TTV DNA presence was observed in 18.6% (08/43) of HPV negative individuals and
14 in 24.32% (18/74) HPV suggestive patients. TTV presence was also investigated in the HPV
15 suggestive patient group, for comparison of cancer and noncancer patients. TTV DNA was
16 significantly more prevalent among HPV suggestive patients presenting cancer (57.14%;
17 08/14) compared to HPV suggestive noncancer patients (16.67%; 10/60).

18 *Conclusions* Thus, the presence of TTV infection could be a risk factor for cancer
19 development in patients suggestive of HPV presenting TTV coinfection. However, further
20 studies are required to clarify the influence of TTV in HPV pathogenesis.

21

22 **Keywords:** TTV DNA, HPV, cervical cancer

23

1 INTRODUCTION

2

3 Cervical cancer is cancer of the uterine cervix. It is a common cause of death
4 among middle-aged women (40-60 years old), with an estimated 493,000 new cases and 274,000
5 deaths worldwide in 2002. Due to the overwhelming burden of this disease in developing countries,
6 cervical cancer is the second most common cause of cancer among women worldwide (1). Currently,
7 the majority of cases occur in developing countries, in which an estimated half million new cancer
8 cases will present human papillomavirus (HPV) comorbidity (2).

9 HPVs are small circular double-stranded DNA viruses, with approximately 8000 base pair
10 (bp) genomes encased in a naked icosahedral capsid about 55 nm in diameter (3).

11 Two major classes of genital HPV types have been identified, depending upon their
12 association with cervical cancer. The “low-risk” types, especially HPV6 and HPV 11, are
13 almost never found in cervical malignancies. In contrast, viral DNAs from the “high-risk”
14 types are identified in most cervical cancer cases, although the vast majority of lesions in
15 which they are found are nonmalignant HPV16 and HPV18 are the two most carcinogenic
16 HPV types, and are responsible for 70% of cervical cancer and about 50% of cervical
17 intraepithelial neoplasia (CIN) grade 3 (CIN3) (4) by contrast, HPV6 and HPV11 are
18 responsible for about 90% of genital warts (5).

19 Cervical cancer development is a multi-step process. The major steps are HPV
20 infection and HPV persistence for over one year, followed by slow progression to
21 precancerous lesions and, eventually, to invasive cancer. Most HPV infections resolve
22 spontaneously in six to 12 months and the majority of precancerous lesions regress due to
23 immune response. Since only a small proportion of HPV infections will eventually lead to
24 cervical cancer, other cofactors are required for cervical cancer development (6). Cofactors
25 that modify the risk in HPV DNA positive women include the use of oral contraceptives for

1 five or more years, smoking, high parity and previous exposure to other sexually transmitted
2 diseases (7).

3 Szládek et al (8) reported that coinfection with a virus named Torque Teno Virus (TTV),
4 belonging to genogroup 1, and HPV promotes the progression of squamous cell carcinoma of the
5 larynx and is associated with an unfavorable prognosis. This TT virus was first described in patients
6 with posttransfusion hepatitis by Nishizawa et al (9), who designated this agent as TTV after the
7 initials of the patient in whom it was discovered. The viral genome is a circular molecule of negative-
8 sense single stranded DNA of approximately 3.8 kb and is organized in at least two open reading
9 frames and a noncoding region (UTR) containing regulatory elements believed to be involved in virus
10 replication (10).

11 Several studies have shown that TTV is distributed widely throughout the world
12 (11),(12).

13 No pathological role for TTV infection has been established; however, the high prevalence of
14 the virus in the general population leads to frequent coinfections with other viruses (13). The role of
15 TTV in HPV infection and progression to cervical cancer have never been related.

16 The aim of the present study was to investigate TTV presence in HPV suggestive women and
17 in controls, in order to elucidate any possible influence on cancer development.

18

19 **METHODS**

20 **Patients.** Following approval from the Human Ethics Committee of the Londrina State
21 University and Maringa State University, peripheral blood cells were collected from 117
22 Brazilian women. Molecular analyses were performed at the State University of Londrina,
23 Parana, Brazil. The samples were examined to investigate the presence of TTV and were

1 collected from women during routine Pap smears, while screening for cervical cancer. They
2 were divided into two groups, HPV suggestive and HPV negative groups.

3 **TTV DNA Detection.** Genomic DNA was isolated from 5 mL of peripheral blood cells
4 (PBCs) extracted from total blood in the presence of 0.2M NaCl, 0.25% SDS, for 4h at 37°C.
5 After precipitation with ethanol, the pellets were dried and resuspended in 50 µL of milli-Q
6 water. The presence of TTV DNA was determined by nested PCR (Polymerase Chain
7 Reaction) using a set of four primers: in the first PCR, RD037 *sense*: 5' GCA GCA GCA
8 TAT GGA TAT GT 3' and RD038 *anti-sense*: 5' TGA CTG TGC TAA GGC CTC TA 3'
9 were used and; in the second PCR, RD051 *sense*: 5' CAT ACA CAT GAA TGC CAG GC 3'
10 and RD052 *anti-sense*: 5' GTA CTT CTT GCT GGT GAA AT 3' were used. The PCR
11 product in this system is a DNA fragment of 197bp located in a region of the large open
12 reading frame (ORF-1) that has been named region N22. Reaction conditions for the two PCR
13 rounds were the same (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP
14 and 1.25 units of Taq polymerase) and consisted of an initial denaturation step of 94°C for 5
15 min, followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min and a final
16 extension of 72°C for 10min using a thermocycler (PCR Sprint, ThermoHybaid, Ashford,
17 Middlesex, UK). PCR products of 197bp were analyzed by electrophoresis on 10%
18 acrylamide gel and detected by a nonradioisotopic technique using a commercially available
19 silver staining method.

20 **Sequencing.** The PCR products were purified using the QIAquick Gel Extraction Kit
21 Protocol (QIAGEN, Hilden, Germany). After purification, PCR[®]4-TOPO[®] Vector plasmid
22 (Carlsba, California, USA) was used for linked reaction and transformation into *Escherichia*
23 *coli* DH5, in accordance with the manufacturer's instructions. Plasmid DNA was obtained
24 using the GFX Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ,
25 USA). DNA was sequenced using the DYEnamic[™] ET dye terminator cycle sequencing kit

1 (Amersham Pharmacia Biotech Inc) in a MegaBace™ sequencer (Amersham Pharmacia
2 Biotech Inc). Sequence analysis of TTV was performed and compared with data in the NCBI-
3 NIH database (Blastn), available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> (14).

4 **Statistical analysis**

5 The data were analyzed by the Chi square (χ^2) test, with the level of significance set at $p < 0.05$.
6 Demographic characteristics were evaluated by ANOVA using Microcal Origin™ 4.1
7 software.

8

9 **RESULTS**

10

11 In this study, DNA samples from 117 Brazilian women aged 13-81 years-old were
12 analyzed, including 43 women negative for HPV and 74 patients suggestive of HPV after
13 routine Papanicolaou examinations (Table 1).

14

15 Table 1. Distribution of HPV negative individuals and HPV suggestive patients according to
16 age.

		HPV (-) (43)	HPV+ (74)
Age (years)	13-28	3	12
	29-44	8	35
	45-60	18	19
	61-76	10	7
	77-92	4	1

17

18

19 Among the HPV suggestive women, an age prevalence of 29-44 years-old was found,
20 whereas among women negative for HPV an age prevalence of 45-60 years-old was found.

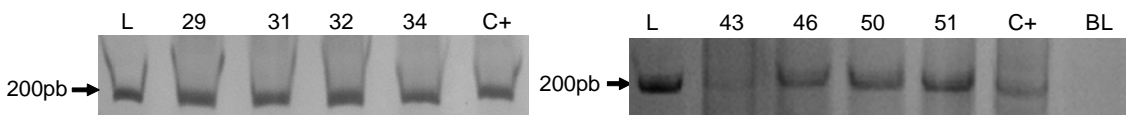
21 Among the 74 HPV suggestive women, observation showed that 60 (81%) were
22 negative and 14 (19%) presented a positive diagnostic for cancer, of which 10 patients

1 developed invasive epidermoid cancer. The age of the cancer patients ranged between 29 and
2 74 years-old.

3 In this work, TTV presence in peripheral blood cells was assessed in all samples, using
4 primers for the N22 region of the large ORF-1 that amplify a 197bp DNA fragment. Figure 1
5 shows the TTV DNA detection, which was amplified by nested PCR for HPV negative and
6 HPV suggestive patients.

7

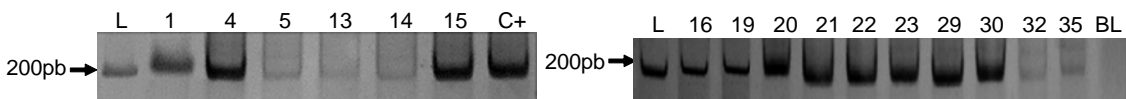
Figure 1A



8
9

10

Figure 1B



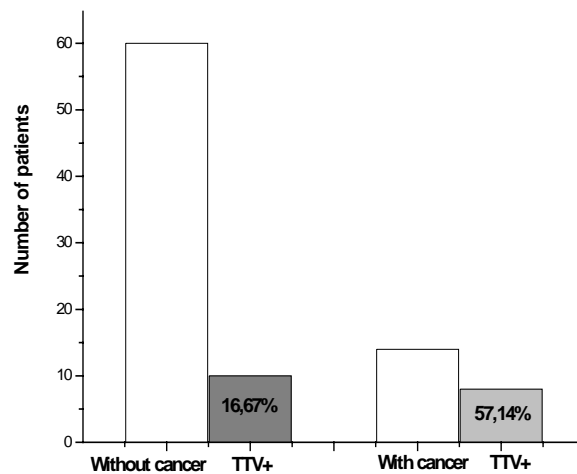
11

12 **Figure 1. Detection of TT virus.** 1A – HPV negative patients. 2A – HPV suggestive patients. PCR products
13 were submitted to electrophoresis in 10% silver-stained acrylamide gels. Amplicons of 197 bp correspond to
14 TTV-DNA. L – ladder 100 bp (Invitrogen); BL – blank reaction; C+ – positive control for TTV .

15

16 TTV DNA presence was observed in 18.6% (08/43) of HPV negative individuals and
17 in 24.32% (18/74) of HPV suggestive patients. TTV presence was also investigated in the
18 HPV suggestive patient group, in order to compare cancer and noncancer patients. TTV DNA
19 was significantly more prevalent in HPV suggestive patients presenting cancer (57.14%;
20 08/14) compared to HPV suggestive noncancer patients (16.67%; 10/60) (Figure 2).

21



1

2

Figure 2. Detection of TTV DNA in HPV suggestive patients. TTV detection was

3 realized as described in Material and Methods. A lower prevalence of TTV DNA occurred among noncancer

4 patients when compared to patients that developed cervical cancer. ($\chi^2 = 10.07$; 1 degree of freedom; $p < 0.01$).

5

6 To analyze primer specificity, the samples were sequenced and compared with data in

7 the National Center for Biotechnology Information (NCBI) NIH database. The analysis

8 demonstrated that the amplified fragment was compatible with a sequence of TTV in the

9 GenBank, under accession AJ244132.

10

11 **DISCUSSION**

12

13 It is well established that high-risk HPV infection causes cervical cancer. HPV is the

14 most prevalent sexually transmitted viral infection among both men and women. It is

15 estimated that 80% of sexually active adults have been infected with at least one HPV type

16 (15).

1 The present work analyzed DNA samples from 117 Brazilian women, including 43
2 individuals negative for HPV and 74 patients suggestive of HPV after routine Papanicolaou
3 examinations.

4 No difference in age range was observed between the HPV suggestive women who
5 presented no cancer and those that developed cervical cancer, with age ranging from 13-81
6 and 29-74 years-old, respectively.

7 Cancer progression was verified in 19% (14/74) of HPV suggestive women, of which
8 10 developed invasive epidermoid cancer.

9 Even though infection with oncogenic HPV genotypes is frequent among sexually
10 active women, most of cases are self-limiting; the development of malignant cervical lesions
11 only occurs in a small proportion of infected women that harbor persistent infections
12 involving oncogenic genotypes.

13 HPV infection alone is not sufficient to elicit cervical cancer development. Certain
14 endogenous and exogenous factors can act as cofactors by influencing the risk of HPV
15 persistence and cancer progression. TTV replication has been demonstrated in hepatocyte and
16 leukocyte cell lines (16). Barril et al (17) verified the presence of TTV in serum and
17 peripheral mononuclear cells from continuous ambulatory peritoneal dialysis using primers
18 for the ORF1 and ORF 2 regions of TTV. It has been suggested that while concealed like a
19 “Trojan horse”, TTV in peripheral blood cells might serve as a TTV reservoir, inducing
20 infection and transmission chronicity in certain clinical and epidemiological settings (18).

21 TTV was originally thought to be a candidate for a new hepatitis virus and although its
22 role in liver disease remains controversial, until its pathogenic potential is fully characterized,
23 it will remain relevant to investigate its implications in individuals presenting coinfections
24 with other viruses (13).

1 This study investigated TTV DNA in the peripheral blood cells of HPV negative and
2 HPV suggestive patients. In the HPV negative individuals, 18.6% (8/43) presented TTV and
3 24.32% (18/74) HPV suggestive patients. Despite the fact that no statistically significant
4 differences occurred between these groups, TTV-DNA was higher in the HPV suggestive
5 patient group. Normally, RT-PCR products are detected in agarose gels, but all the products
6 of this work were detected in acrylamide gels, since these are more sensitive than agarose for
7 this type of detection. The cloned positive PCR samples were compared with the GenBank
8 database and the resulting sequences revealed confirmed identification with GenBank TTV
9 sequences.

10 For TTV DNA detection, N22 primer sets were used. It has been verified that when
11 using PCR with UTR primers, TTV DNA is detected in a very high percentage of samples.
12 TTV DNA was detected by UTR PCR at a high frequency (93%), with no difference in
13 prevalence between blood donors presenting elevated ALT levels and those presenting normal
14 levels. These results demonstrated by Itoh et al (19) indicate that the selection of PCR primers
15 influences TTV DNA detection. Furthermore, these results suggest that restricted TTV
16 genotypes detected by N22 PCR could be associated with liver damage among blood donors.
17 The use of PCR with N22 primers was shown to detect viral strains associated with hepatitis
18 of unknown etiology. Hu et al (20) investigated the ability of specific primer sets to detect
19 known TTV genotypes and verified that the set of primers RD037/038/051/052 only
20 amplified PCR products for genotype 1. Therefore, in this work the presence of TTV DNA in
21 the peripheral blood cells was investigated using N22 primers specific for TTV genotype 1.

22 Other factors pertaining to HPV infection, such as variants, viral load, viral integration
23 and multiple infections may modify viral-host biological interaction and play a role in the
24 development of cervical cancer.

1 The irregular regeneration of hepatocytes in TTV positive patients has been described
2 as significantly higher than that found in TTV negative patients (21). Kooistra et al (22) has
3 proposed that TT virus-derived apoptosis-inducing protein preferentially induces apoptosis in
4 hepatocellular carcinoma-derived cells. Camci et al (23) described a high prevalence of TTV
5 in cancer patients. Therefore, the presence of TTV was also investigated regarding the HPV
6 suggestive patient group presenting cancer. TTV was significantly more prevalent among
7 HPV suggestive patients (57.14%; 8/14) than among detected HPV suggestive noncancer
8 patients (16.67%; 10/60) ($p < 0.01$).

9 Many reports state that although TTV does not appear to contribute to the
10 development of human hepatocellular carcinoma from chronic liver disease, it may be a risk
11 factor for the development of hepatocellular carcinoma in patients presenting type C liver
12 disease (24),(25).

13 In conclusion, TTV is more prevalent in patients suggestive of HPV presenting
14 cervical cancer. Although the pathogenesis of TTV remains unknown, it may be a risk factor
15 for the development of cancer in patients suggestive of HPV that present TTV coinfection.

16

17 **ACKNOWLEDGEMENTS**

18 The authors would like to acknowledge the volunteers who made this study possible. This
19 study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
20 (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the
21 Londrina State University Coordination for Postgraduation (PROPPG-UEL). Patricia Sayuri
22 Suzuki is a fellow of CAPES.

23

1 REFERENCES

- 2 (1) Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ,
3 Meijer CJ (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated
4 with cervical cancer. *N Engl J Med* 348:518-27.
- 5
- 6 (2) World Health Organization (2007), Human Papillomavirus and HPV vaccines: Technical
7 information for policy-makers and health professionals.
- 8
- 9 (3) Sinal S.H. & Woods C.R (2005). Human Papillomavirus infections of the genital and respiratory
10 tracts in young children. *Semin Pediatr Infect Dis.* 16:306-316.
- 11
- 12 (4) Smith J.S., Lindsay L., Hoots B., Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM (2007).
13 Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical
14 lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer.* 121: 621-632.
- 15
- 16 (5) Schiffman M., Castle P.E., Jeronimo J., Rodriguez A., Wacholder S (2007). Human
17 papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 370:890-907.
- 18
- 19 (6) Schiffman M. & Kjaer S.K (2003). Chapter 2: Natural history of anogenital human
20 papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr.* pp 14-9.
- 21
- 22 (7) Bosch FX, Sanjosé S (2007). The epidemiology of human papillomavirus infection and
23 cervical cancer. *Dis Markers* 23(4):213-27.
- 24

- 1 (8) Szládek G, Juhász A, Kardos G, Szoke K, Major T, Sziklai I, Tar I, Márton I, Kónya J,
2 Gergely L, Szarka K (2005). High co-prevalence of genogroup 1 TT virus and human
3 papillomavirus is associated with poor clinical outcome of laryngeal carcinoma. *J. Clin.*
4 *Pathol.* 58:402-405
5
- 6 (9) Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M (1997). A
7 novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in post transfusion
8 hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Comm.* 241:92-7.
9
- 10 (10) Bendinelli M, Pistello M, Maggi F, Fornai C, Freer G, Vatteroni ML (2001). Molecular
11 Properties, Biology, and Clinical Implications of TT Virus a Recently Identified Widespread
12 Infectious Agent of Humans. *Clin Microbiol Rev.* 98-113.
13
- 14 (11) Vasconcelos HCF, Gomes SA, Cataldo M, Niel C (2003). Prevalence and genetic
15 diversity of TT virus genotype 21 (yonban virus) in Brazil. *Arch Virol.* 148:517-29.
16
- 17 (12) Kalkan A, Ozdarendeli A, Bulut Y, Saral Y, Ozden M, Kelestimur N, Toraman Z.A
18 (2005). Prevalence and genotypic distribution of hepatitis GB-C/HG and TT viruses in blood
19 donors, mentally retarded children and four groups of patients in eastern Anatolia, Turkey.
20 *Jpn J Infect Dis.* 58(4):222-7.
21
- 22 (13) Thom K & Petrik J (2007). Progression towards AIDS leads to increased torque teno
23 virus and torque teno minivirus titers in tissues of HIV infected individuals. *J. Med. Virol.*
24 79:1-7.
25

- 1 (14) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>.
- 2 (15) Baseman, J.G. & Koustsky L.A (2005). The Epidemiology of human papillomavirus
3 infections. *J Clin Virol.*, 32 Suppl 1, s16-24.
- 4
- 5 (16) Desai M, Pal R, Deshmukh R, Banker D (2005). Replication of TT virus in hepatocyte
6 and leukocyte cell lines. *J Med Virol.* 77:136-43.
- 7
- 8 (17) Barril G, López-Alcorocho JM, Bajo A, Ortiz-Movilla N, Sánchez-Tomero JA,
9 Bartolomé J, Selgas R., Carrenõ V (2000). Prevalence of TT virus in serum and peripheral
10 mononuclear cells from a CAPD population. *Perit Dial Int.* 20:65-8.
- 11
- 12 (18) Zhong S, Yeo W, Tang M, Liu C, Lin X-R, Ho WM, Hui P, Johnson PJ (2002). Frequent
13 detection of the replicative forms of TT virus DNA in peripheral blood mononuclear cells and
14 bone marrow cells in cancer patients. *J Med Virol.* 66:428-34.
- 15
- 16 (19) Itoh K, Takahashi M, Ukita M, Nishizawa T, Okamoto H (1999). Influence of primers on
17 the detection of TTV virus DNA by polymerase chain reaction. *J Infect Dis.* 180:1750-1.
- 18
- 19 (20) Hu Y.W., Al-Moslih M.I., Ali M.T.A, Khameneh S.R., Perkins H., Diaz-Mitoma F., Roy
20 J.N., Uzicanin S., Brow E.G (2005). Molecular detection method for all known genotypes of
21 TT virus (TTV) and TTV-like viruses in thalassemia patients and healthy individuals. *J Clin*
22 *Microbiol.* 43: 3747-54.
- 23

- 1 (21) Moriyama M., Matsumura H., Shimizu T., Shioda A., Kaneko M., Miyazawa K., Miyata H.,
2 Anaka N., Uchida T., Arakawa Y (2001). Histopathologic impact of TT virus infection on the liver of
3 type C chronic hepatitis and liver cirrhosis in Japan. *J.Med.Virol.* 64:74-81.
4
- 5 (22) Kooistra K., Zhang Y.H., Henriquez N.V., Weiss B., Mumberg D., Noteborn M.H.M
6 (2004). TT virus-derived apoptosis preferentially in hepatocellular carcinoma-derived cells. *J*
7 *Gen Virol.* 85: 1445-1450.
8
- 9 (23) Camci C., Guney C., Balkan A., Buyukberber N., Buyukberber S., Kadayifci A., Kubar
10 A (2002). The prevalence of TT virus in cancer patients. *New Microbiol.* 25: 463-468.
11
- 12 (24) Yoshida H., Kato N., Shiratori Y., Lan K.H., Ono-Nita S.K., Feng Z., Shiina S., Omata
13 M (2000). Poor Association of TT virus viremia with hepatocellular carcinoma. *Liver.*
14 20:247-252.
15
- 16 (25) Pineau P., Meddeb M., Raselli R., Oin L.X., Terris B., Tang Z.Y., Tiollais P.,
17 Mazzaferro V., Dejean A (2000). Effect of TT virus infection on hepatocellular carcinoma
18 development: results of a Euro-Asian survey. *J.Infect Dis.* 181:1138-1142.
19

1 **ANEXO V**2 **ARTIGO 2**3 **TÍTULO: Investigating association of chemokine receptor 5 (CCR5) polymorphism**
4 **with cervical cancer in human papillomavirus (HPV) suggestive patients.**5 **ABSTRACT**

6 Cervical cancer development is a multi-step process. The major steps are HPV
7 infection and HPV persistence for over one year, followed by slow progression to
8 precancerous lesions, and eventually to invasive cancer. It is known that chemokines are
9 important determinants of the early inflammatory response. Physiologically, chemokine
10 receptors mediate the chemotaxis of T cells and phagocytes to areas of inflammation. The CC
11 chemokine receptor 5 (CCR5) gene product is a member of the seven transmembrane G-
12 protein-coupled receptor family, which responds to normal beta-chemokine ligands, and is
13 involved in the chemotaxis of leukocytes toward inflammation sites. In the present study,
14 polymerase chain reactions (PCR) in genomic DNA samples, using specific CCR5
15 oligonucleotide primers surrounding the breakpoint deletion, detected a 225bp product from
16 the normal CCR5 allele and a 193bp product from the 32bp deletion allele.

17 The wild type genotype was prevalent in both group, but it wasn't statistically significant
18 with $\chi^2 = 1,519$ (2 degrees of freedom; $p > 0.05$). Once there is a small number of $\Delta 32$ allele
19 carriers, further studies are needed to clarify the role of CCR5 in the cervical cancer.

20 Keywords: cervical cancer, CCR5, HPV,

21

1 INTRODUCTION

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

There were about 500 000 incident cases of and 275 000 deaths due to cervical cancer worldwide in the last years, equivalent to about a tenth of all deaths in women due to cancer (Parkin et al., 2005). The burden of cervical cancer is disproportionately high (>80%) in the developing world (Parkin and Bray, 2006).

Cervical cancer development is a multi-step process. The major steps are HPV infection and HPV persistence for more than one year, followed by slow progression to pre-cancerous lesions ant to invasive cancer. The risk factors for persistence and pre-cancer have not been disentangled (Kjaer et al., 2006; Shiffman et al., 2007), as well the relative importance of genetic and environment factors in the development of cervical tumors are not known yet (Zheng et al., 2006).

In addition to the loss of cellular control mechanisms, the role of antigen-specific tumor infiltrating leukocytes and other immunocompetent cells have been considered as decisive factors in cervical pathogenesis (O'Brien et al., 2001; Evans et al., 1997). As well microbial persistence in or around epithelial cells may lead to a chronic inflammatory state resulting in increased epithelial cell turnover, and provides a stimulus for recruitment and activation of inflammatory cells from the blood stream (Moss and Blaser, 2005).

Chemokines and their receptors expression have shown a potential function in immunity against cervical tumor (Ghaderi et al., 2000; Kleine-Lowinski et al., 1999; Ohta et al., 2002). They are small chemotactic cytokines that direct the migration of leukocytes during inflammation and organize homing of lymphocytes and macrophages into secondary lymphoid organs. Chemokines also promote the adhesiveness of target cells, regulate angiogenesis and may consequently control tumor growth (Rossi and Zlotnik, 2000). The receptors for chemokines are mainly expressed on immune and inflammatory cells, such as B- and T-lymphocytes and professional antigen-presenting cells in which ligand-receptor interactions on these cells lead to cell migration (Zheng et al., 2006).

Since cytokines, chemokines and free radicals initiate and perpetuate inflammatory responses, gene polymorphisms or genetic variations in immune related genes might be related to HPV persistence and progression to cancer (Moss and Blaser, 2005).

CC chemokine receptor 5 (CCR5) is involved in the chemotaxis of leukocytes toward inflammatory sites (Baggiolini, 1998), and is present only in certain cell types, as lymphocytes, dendritic cells and macrophages (Loetscher et al., 1998).

1 CCR5 Δ 32, a mutant allele of CCR5 receptor gene, has been characterized and it
2 causes significant defects in the chemotaxis mediated by CCR5 ligands. Therefore the aim of
3 this study was to investigate the association of human papillomavirus (HPV) infection and
4 cancer progression to chemokine receptor 5 (CCR5) polymorphism.

5 6 7 **METHODS**

8
9 **Patients.** Following approval from the Human Ethics Committee of Londrina State
10 University and Maringa State University, peripheral blood cells were collected from 117
11 Brazilian women. Molecular analyses were performed at Londrina State University, Parana,
12 Brazil. They were divided into two groups, HPV suggestive and HPV negative groups. The
13 samples were collected from women under Pap smears routine proceedings for screening of
14 cervical cancer.

15 **DNA extraction:** Genomic DNA was isolated from peripheral blood cells using the technique
16 described by Miller (1988). Briefly, DNA was extracted from whole blood in the presence of
17 0.2M NaCl and 0.25% SDS, for 4h at 37°C. After precipitation with ethanol, the pellet was
18 dried and resuspended in 50 μ L of milli Q water.

19 **CCR5 Genotyping.** DNA was analyzed using polymerase chain reaction (PCR) with specific
20 primers for CCR5 which were, Primer sense: 5' ACC AGA TCT CAA AAA GAA 3' and
21 Primer anti-sense: 5' CAT GAT GGT GAA GAT AAG CCT CA 3', GenBank Accession
22 number: AF009962. Reaction conditions for the PCR rounds were the same (20 mM Tris-HCl
23 pH 8.4, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 200 μ M dNTP and 1.25 units of Taq polymerase). PCR
24 procedure was 5 min denaturation at 94°C, 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 58°C and 1
25 min at 72°C, and 10 min elongation at 72°C, carried out in a thermocycler (PCR sprint,
26 ThermoHybaid, Ashford, Middlesex, UK). All DNA amplification reactions were performed
27 with appropriate negative controls in parallel to detect contamination at each step of the
28 procedure. PCR products of 225 and 193 base pairs were analyzed by electrophoresis in a
29 10% acrylamide gel and visualized using silver staining method.

30 **Statistical analysis.** Data were analyzed by the chi-square (χ^2) test with the level of
31 significance set at $p < 0.05$. Demographic characteristics were evaluated by ANOVA, Microcal
32 Origin™ 4.1.

33
34

1 RESULTS

2 In this study DNA samples from 117 Brazilian women, aged 13-81 years old, were
3 analyzed, including 43 women negative for HPV and 74 patients suggestive of HPV after
4 Papanicolaou examinations (Table 1).

5

6 Table 1. Distribution of HPV negative patients and HPV suggestive patients according to age.

7

		HPV (-)	HPV+ (74)
Age (years)	13-28	3	12
	29-44	8	35
	45-60	18	19
	61-76	10	7
	77-92	4	1

8

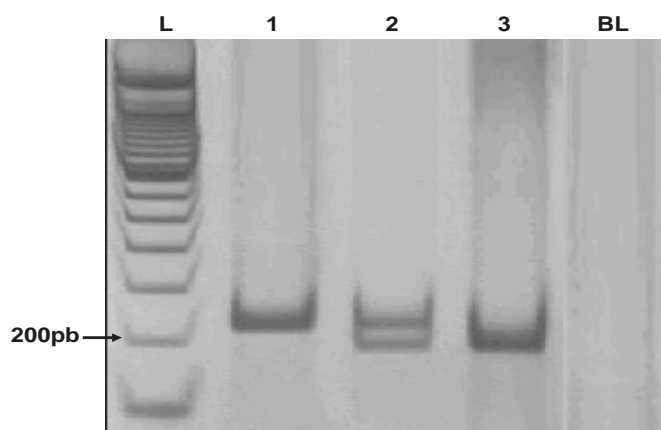
9

10 Among the HPV suggestive women, an age prevalence of 29-44 years-old was found,
11 whereas among women negative for HPV was observed an age prevalence of 45-60 years-old.
12 Although there is a slightly prevalence of women aged 29-44 years old, there was no
13 significant difference when both groups were compared ($p=0,36347$).

14

Figure 1 shows a breakdown of genotypes, wild-type (CCR5/CCR5) and $\Delta 32$ allele.

15



16

17 Figure 1. CCR5 Genotype. The PCR products were detected using silver staining method in
18 polyacrylamide gel. L: DNA Ladder 100 pb; 1, CCR5 wild type homozygous genotype (225
19 pb); 2 heterozygous genotype (193 pb and 225 pb); and 3 variant allele homozygous genotype
20 (193 pb) and BL represents Blank reaction.

21

22

1 The analysis of CCR5 gene polymorphism shows that genotype distribution is similar
2 between HPV negative individuals and HPV suggestive patients (Table 2).

3
4
5 Table 2. Genotypic and allelic frequencies for the $\Delta 32$ and wt alleles of CCR5.
6

Study subjects	Number of samples	Genotype (117) ^a			Allelic frequency	
		CCR5/CCR5	CCR5/ $\Delta 32$	$\Delta 32/\Delta 32$	wt	$\Delta 32$
HPV negative	43 *	38	04	01	0.93	0.07
HPV suggestive	74 **	70	03	01	0.97	0.03

7 * HWE = 3,429

8 ** HWE = 13,48

9 ^a HPV negative patients X HPV suggestive patients $\chi^2 = 1,47$ (2 degrees of freedom;
10 $p > 0.05$)

11
12
13 Regarding genotype distribution, the HPV negative patients group is in accordance to
14 Hardy Weinberg equilibrium, however HPV suggestive patients group showed a significant
15 deviation from Hardy Weinberg equilibrium, what may be supported by the small sample
16 numbers.

17 In both groups, the wild type genotype was more prevalent, and there was no
18 significant difference in genotype and allele distribution between analyzed groups ($p > 0,05$).
19 In spite of the wt/wt genotype predominance, 11,6% from HPV negative individuals were $\Delta 32$
20 allele carriers comparing with 5,4% from HPV suggestive patients.

21 Among the 74 HPV suggestive women, 60 (81%) were negative and 14 (19%)
22 presented a positive diagnostic for cancer, of which 10 patients developed invasive
23 epidermoid cancer. The age of the cancer patients ranged between 29 and 74 years-old.

24 Among cervical cancer patients (n=14) 13 patients presented the wild type genotype
25 and only one patient presented the heterozygous genotype.
26

1 DISCUSSION

2

3 Human papillomavirus (HPV) is common throughout the world. Although most
4 infections with HPV cause no symptoms and are self-limiting, persistent genital HPV
5 infection can cause cervical cancer in women (zur Hausen, 1987; Walboomers et al., 1999).

6 The present work analyzed DNA samples from 117 Brazilian women, including 43
7 individuals negative for HPV and 74 HPV suggestive patients after routine Papanicolaou
8 examinations.

9 It was observed no difference in age range between HPV suggestive women without
10 cancer and the ones that developed cervical cancer, aged 13-81 and 29-74 years old,
11 respectively.

12 Cancer progression was verified in 19% (14/74) of HPV suggestive women, of which
13 10 developed invasive epidermoid cancer. Since only a small proportion of HPV infections
14 will eventually lead to cervical cancer, other cofactors are needed for cervical cancer
15 development (Schiffman and Kjaer, 2003). The relative importance of genetic and
16 environment factors in the development of cervical tumors is not known yet (Zheng et al.,
17 2006).

18 Chemokines are important determinants of the early inflammatory response. It is
19 known that chemokines have the potential to stimulate T-cell activation, although the pattern
20 of activation may differ for different chemokine-chemokine receptor interactions (Nanki and
21 Lipsky, 2001). CCR5 plays an important role in the recruitment of macrophages, monocytes
22 and T cells in inflammation (Panzer et al., 2005, Spagnolo et al., 2005) driving an immune
23 response involving a Th1 cytokine pattern (Loetscher et al., 1998).

24 The CC chemokine receptor 5 (CCR5) delta 32 variant results in a non-functional
25 form of the chemokine receptor, which is incapable of binding beta chemokines (RANTES,
26 MIP-1alpha, MIP-1beta). CCR5 Δ 32 causes significant defects in the chemotaxis mediated by
27 these ligands, once CCR5 Δ 32 deletion may alter expression or the function of the protein
28 product (Yang et al., 2004; Smith et al., 1997). Recent evidence has also demonstrated the
29 role of CCR5 in a variety of human diseases, ranging from infectious and inflammatory
30 diseases to cancer (Balistreri et al., 2007).

31 Host immunity, particularly T cell immunity (Th1/Th2 balance), plays an important
32 role in clinicopathological features of malignant disease (Fujii et al., 2004). Vaday et al.
33 (2006) suggested that the pathogenesis of prostate cancer is influenced by inflammation,
34 specially by inflammatory chemokines, such as CCL5 (RANTES).

1 Oliveira et al. (2007) has proposed that leishmaniasis patients with mucocutaneous
2 lesions present a stronger T-cell response and that delta32 carriers could have had a weaker
3 inflammatory immune response and migratory capacity due to the non-functional chemokine
4 receptor.

5 Although there was no difference in CCR5 Δ 32 distribution between assessed groups
6 in the present work, it was observed that 92,8% (13/14) of cancer patients presented the wild
7 type genotype, and only one patient presented the variant allele in heterozygous state. What
8 may be explained by a stronger inflammatory response, due HPV infection in wild type
9 patients.

10 In conclusion, it was not observed any correlation between human papillomavirus
11 (HPV) infection and chemokine receptor 5 (CCR5) polymorphism. However, due to the small
12 number of Δ 32 allele carriers examined and since CCR5 is an inflammatory chemokine,
13 further studies are needed to elucidate CCR5 role in cervical cancer pathogenesis.

14 **ACKNOWLEDGEMENTS**

15 This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
16 Tecnológico - CNPq, and Patricia Sayuri Suzuki received a fellowship from CAPES
17 (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES) and Pro-Reitoria
18 de Pós-Graduação - Londrina State University- PROPG-UEL. We acknowledge Prof. Philip
19 Sidney Pacheco Badiz for English correction

20 **REFERENCES**

21
22 Baggiolini, M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, New York, v.392, n.6676, p.565-
23 568, 1998.

24 Balistreri, C.R. et al. CCR5 receptor: biologic and genetic implications in age-related
25 diseases. *Ann N Y Acad Sc*, New York, v.1100, p.162-172., 2007.

26
27 Evans, E.M.. Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific
28 cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res.*, Philadelphia, v.57, p.2943-2950, 1997.

29
30
31
32

- 1 Fujii, A. et al. Differential expression of chemokines, chemokine receptors, cytokines and
2 cytokine receptors in diffuse large B cell malignant lymphoma. *Int J Oncol.*, Athens, v.24,
3 n.3, p.529-538, 2004.
4
- 5 Ghaderi, M. et al. Tumor necrosis factor a-11 and DR15-DQ6 (B*0602) haplotype increases
6 the risk for cervical intraepithelial neoplasia in human papillomavirus 16 seropositive women
7 in Northern Sweden. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, Philadelphia, v.9, n.10, p.1067-
8 1070, 2000.
9
- 10 Kjaer, S.K. et al. The burden of genital warts. A study of nearly 70,000 women from Nordic
11 countries. *Proceedings of European Research Organization on Genital Infection and Neoplasia*
12 *(EUROGIN)*, Paris, France, April 23-26 2006 (Abstract SS21-04).
13
- 14 Kleine-Lowinski, K. et al. Monocyte-chemo-attractant-protein-1 (MCP-1)-gene expression in
15 cervical intra-epithelial neoplasias and cervical carcinomas. *Int J Cancer*, Hoboken, v.82, n.1,
16 p.6-11, 1999.
17
- 18 Loetscher, P. et al. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature*, New York, v.391,
19 n.6665, p 344-345, 1998.
20
- 21 Miller, S.A. et al. A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated
22 cells. *Nucl Acid Res.*, Oxford, v.16, n.3, p.1215, 1988.
23
- 24 Moss, S.F.; Blaser, M.J. Mechanisms of disease: Inflammation and the origins of cancer. *Nat*
25 *Clin Pract Oncol.*, New York, v.2, n.2, p.90-97, 2005.
26
- 27 Nanki, T.; Lipsky, P.E. Stimulation of T-cell activation by CXCL12/SDF-1 involves a G-
28 protein mediated signaling pathway. *Cell Immunol.*, Amsterdam, v.214, n.2, p.145-154, 2001.
29
- 30 O'Brien, P.M. et al. Immunoglobulin genes expressed by B-lymphocytes infiltrating cervical
31 carcinomas show evidence of antigen-driven selection. *Cancer Immunol Immunother.*, Berlin
32 / Heidelberg, v.50, n.10, p.523-532, 2001.
33

- 1 Ohta, M. et al: Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage
2 infiltration and tumor vascularity in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int J*
3 *Cancer*, Hoboken, v.102, n.3, p.220-224, 2002.
- 4
- 5 Oliveira, K.B. et al. Analysis of the CC chemokine receptor 5 delta32 polymorphism in a
6 Brazilian population with cutaneous leishmaniasis. *J Cutan Pathol.*, Charlottesville, v.34, n.1,
7 p. 27-32, 2007.
- 8
- 9 Panzer, U. et al. The chemokines receptor 5 Delta32 mutation is associated with increased
10 renal survival in patients with IgA nephropathy. *Kidney Int.*, New York, v.67, n. 1, p. 75-81,
11 2005.
- 12
- 13 Parkin, D.M. et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.*, Atlanta, v.55, n.2, p.74-
14 108, 2005.
- 15
- 16 Parkin, D.M.; Bray, F. Chapter 2: the burden of HPV-related cancers. *Vaccine*, Surrey,
17 24(suppl 3):S11–25, 2006.
- 18
- 19 Rossi, D.; Zlotnik, A. The Biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol.*,
20 Palo Alto, v.18, p.217-242, 2000.
- 21
- 22 Schiffman, M.; Kjaer, S.K. Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus
23 infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr.*, Bethesda, v.31, p.14-19, 2003.
- 24
- 25 Schiffman, M. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*, Oxford, v.370,
26 n.9590, p.890-907, 2007.
- 27
- 28 Smith, M.W. et al. Contrasting influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV infection and
29 disease progression. *Science*, Washington , v.277, n. 5328, p.959-965, 1997.
- 30
- 31 Spagnolo, P. et al. C-C chemokines receptor 5 gene variants in relation to lung disease in
32 sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.*, New York, V.2, n.6, p.721-728, 2005.

- 1 Vaday et al. Expression of CCL5 (RANTES) and CCR5 in prostate cancer. *Prostate*, v.66, n.2,
2 p.124-134, 2006.
- 3
- 4 Walboomers, J.M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical
5 cancer worldwide. *J Pathol.*, Hoboken, v.189, n.1189, p.12-19, 1999.
- 6
- 7 Yang, X. et al. Analysis of the CC chemokine receptor (CCR5) Delta32 polymorphism in
8 Behcet's disease. *Eur J Immunogenet*, v.31, n.1, p.11-14, 2004.
- 9
- 10 Zheng, B. et al. Genetic polymorphism of chemokines receptors CCR2 and CCR5 in Swedish
11 cervical cancer patients. *Anticancer Research*, Kapandriti, v.26, n.5B, p.3669-3674, 2006.
- 12
- 13 Zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancer. *Appl Pathol*, v.5, n.1, p.19-24, 1987.
- 14
- 15
- 16

1 ANEXO VI - CAPÍTULO DE LIVRO

2

3 **TÍTULO DO LIVRO: Educar para a preservação da saúde e da qualidade de vida -**
4 **Organizador: Sandra Odebrecht Vargas Nunes.**

5

6

CAPÍTULO 3

7

8

9

10

Maria Angelica Ehara Watanabe

11

Sandra Odebrecht Vargas Nunes

12

Patricia Sayuri Suzuki

13

14

15

16

17

Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

18

Infecção pelo Papilomavirus Humano (HPV)

19

Coinfecção pelo HIV e HPV

20

21

22

*“Os homens que sabem o porquê,
podem adaptar-se a qualquer circunstância”*

23

24

FREDERICH NIETZSCHE

25

1 Na adolescência, as relações sexuais têm início precoce e com maior número de
2 parceiros, o que contribui para aumentar a ocorrência das infecçõesw sexualmente
3 transmissíveis como por HIV e HPV. Entre adolescentes, o uso de preservativos é baixo e a
4 atividade sexual não é programada. Estudos brasileiros revelam que apenas um terço deles ou
5 menos usa preservativo em todas as relações sexuais. Segundo dados de pesquisa divulgados
6 pelo Ministério da Saúde, os mais baixos índices de uso de preservativos se encontram entre
7 jovens com 15 e 19 anos de idade.

8 3.2 Infecção pelo Papilomavirus Humano (HPV)

9

10 O condiloma acuminado é uma lesão na região genital, causada pelo vírus
11 Papilomavirus Humano (HPV). A doença é também conhecida como crista de galo, figueira
12 ou cavalo de crista. O HPV provoca verrugas com aspecto de couve-flor e de tamanhos
13 variáveis nos órgãos genitais. Pode ainda estar relacionado ao aparecimento de alguns tipos de
14 câncer, principalmente no colo do útero, mas também no pênis ou no ânus. Porém, nem todo
15 caso de infecção pelo HPV irá causar câncer.

16 A maioria destas infecções é temporária, porém uma pequena porção de mulheres
17 infectadas com subtipos de alto risco apresenta infecções persistentes e estão mais propensas a
18 desenvolver lesões cervicais malignas. A persistência da infecção pelo HPV é devida,
19 principalmente, a sua habilidade de evadir-se do sistema imune. Infecções são comumente
20 transmitidas por contato sexual e resultam inicialmente em lesões discretas. No Brasil, estima-
21 se que o câncer de colo do útero seja a quinta neoplasia maligna mais comum entre as
22 mulheres, sendo superado pelo câncer de pele (não-melanoma) e pelo câncer de mama.
23 Estudos epidemiológicos apontam para uma alta incidência de infecção em mulheres jovens e
24 para um decréscimo da infecção com a idade. Infecções persistentes representam o fator de
25 risco mais significativo para desenvolvimento de câncer cervical em mulheres idosas.

26 Papilomavirus humano (HPV) de alto risco é um fator necessário para o
27 desenvolvimento de câncer cervical. Contudo, somente uma pequena proporção de mulheres

1 infectadas pelo HPV desenvolverá câncer cervical; muitos outros co-fatores podem aumentar
2 a persistência da infecção e sua oncogênese.

3 Câncer cervical é o câncer da cérvix uterina, sendo este tipo o que mais afeta as
4 mulheres nos países em desenvolvimento. Tem sido estimado que esta patologia é responsável
5 por quase 260.000 mortes em 2005, os quais 80% ocorreram em países em desenvolvimento
6 (WHO, 2007).

7 O trato genital inferior feminino compreende quatro discretas regiões anatômicas
8 (Pudney *et al.*, 2005): O intróito, o qual está recoberto por um epitélio escamoso estratificado
9 ceratinizado parecido com a pele; a mucosa vaginal, o qual é recoberto por um epitélio
10 escamoso estratificado não-ceratinizado, aglandular; a ectocérvix, o qual é recoberto por uma
11 mucosa histologicamente similar ao da vagina; a endocérvix, que consiste num epitélio
12 colunar com numerosas glândulas (pseudo-glândulas).

13 A zona de transformação (TZ) ou junção escamo-colunar (JEC) representa uma
14 abrupta transição entre a ectocérvix e endocérvix, sendo o principal local de infecção pelo
15 papilomavírus humano (HPV) (Pudney *et al.*, 2005). É estimado que o HPV cause
16 aproximadamente meio milhão de novos cânceres cada ano (WHO, 2007).

17 O HPV é um vírus DNA dupla-fita circular, com aproximadamente 8000 pares de
18 bases contidos num capsídeo icosaédrico de aproximadamente 55nm de diâmetro (Munger *et*
19 *al.*, 2004; Sinal & Woods, 2005) e infecta as células da pele ou mucosa (de Villiers, 1997).

20 Existem mais de 100 genótipos de HPV conhecidos, os quais foram numerados
21 de acordo com a ordem de descoberta (de Villiers, 1997).

22 Diferentes HPVs são geralmente agrupados de acordo com sua associação com
23 câncer cervical ou lesões pré-cancerosas e sua seqüência genômica em: tipos de alto risco de
24 câncer (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82), tipos de prováveis
25 causadores de câncer de alto risco (26, 53 e 66) e tipos de baixo risco de câncer (6, 11, 42, 43,

1 44, 54, 61, 70, 72, 81 e 89). HPVs de baixo risco são encontrados principalmente em verrugas
2 genitais, enquanto HPVs de alto risco são encontrados em câncer cervical e lesões pré-
3 cancerosas (Munoz *et al.*, 2003).

4 HPV16 e HPV18 são os dois tipos de HPV mais carcinogênicos, sendo
5 responsáveis por 70% do câncer cervical e aproximadamente 50% da neoplasia intraepitelial
6 cervical (CIN3) (Smith *et al.*, 2007); em contraste HPV 6 e HPV 11 são responsáveis por
7 aproximadamente 90% das verrugas genitais (Schiffman *et al.*, 2007).

8 Uma maior prevalência de HPV é encontrado em mulheres sexualmente ativas
9 menores de 25 anos de idade. O HPV genital é encontrado em aproximadamente 10-40%
10 dessas mulheres. A maioria dessas infecções parece ser auto-limitada e não está associada
11 com alterações citológicas detectáveis pela triagem do Papanicolaou. A minoria das mulheres
12 HPV-positivo desenvolvem alterações citológicas de baixo grau (Becker *et al.*, 1991; de
13 Villiers *et al.*, 1992; Schiffman, M.H., 1992). A maior incidência de lesões de alto grau
14 ocorrem em mulheres com mais de 25 anos de idade, enquanto que a maior incidência de
15 câncer cervical ocorrem em mulheres com mais de 35 anos (Schiffman, M.H., 1992). Estes
16 achados sugerem que HPV de alto risco, normalmente produzem uma infecção inaparente
17 transitória na área cérvico-vaginal. Algumas mulheres desenvolvem uma infecção persistente
18 nesse tecido, talvez como resultado de um mecanismo de defesa deficiente. Lesões
19 persistentes podem progredir para câncer cervical nessas mulheres (Lowy *et al.*, 1994).

20 O rastreamento com o esfregaço de Papanicolaou é muito eficaz na prevenção do
21 câncer cervical porque a maioria dos cânceres é precedida por uma lesão pré-cancerosa. Essa
22 lesão pré-cancerosa pode permanecer em um estágio não invasivo durante um período muito
23 longo de tempo (por exemplo, 20 anos) e desprender células anormais que podem ser
24 detectadas pelo exame citológico (Robbins & Cotran, 2007) e são usualmente classificados
25 em dois sistemas (Richart, 1973).

1 O sistema Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) foi introduzido em 1973 e é
2 baseado na arquitetura tecidual (Richart, 1973). NIC1 refere-se à células anormais ocupando o
3 1/3 da região mais superficial do estrato epitelial cervical, NIC2 indica que 2/3 do epitélio
4 está sendo ocupado e NIC3 indica que toda camada epitelial está ocupada. NIC1, NIC2 e
5 NIC3 descrevem diferentes processos – NIC1 indica uma infecção por HPV auto-limitada, e
6 NIC2 ou NIC3 são efetivos precursores de câncer cervical (Kiviat & Koutsky, 1993). Em
7 1988 foi introduzido outro sistema da classificação, o Sistema Bethesda. Este classifica
8 anormalidades citológicas em: lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL) ou lesão intraepitelial
9 de alto-grau (HSIL) (Solomon *et al.*, 2002). LSIL corresponde ao NIC1 e infecção por HPV; e
10 HSIL corresponde ao NIC2, NIC3 e carcinoma in situ.

11 Existem dois tipos principais de câncer cervical: Carcinoma de células escamosas e
12 adenocarcinoma. Aproximadamente 80% dos cânceres cervicais são carcinoma de células
13 escamosas, enquanto os 20% restante são adenocarcinomas e câncer cervical de outras origens
14 (DiSaia PJ, 1997).

15 O desenvolvimento de câncer cervical está fortemente associado com infecção genital
16 de tipos oncogênicos de papilomavirus humano (HPV). Contudo a maioria das mulheres
17 infectadas por HPV nunca desenvolveram câncer, então, parecem ser necessários fatores
18 adicionais. A relativa importância de fatores genéticos e ambientais no desenvolvimento do
19 tumor cervical ainda é desconhecida (Zheng *et al.*, 2006).

20

21

22 3.3 Co-infecção pelo HPV e HIV

23 Estudos recentes têm demonstrado haver um microambiente imunológico no trato
24 genital feminino, e a resposta imune é afetada por hormônios bem como infecções e processos
25 inflamatórios (Pudney *et al.*, 2005).

1 A imunidade humoral no trato genital feminino é mediada pela ação das
2 imunoglobulinas IgA e IgG secretadas em abundância na lâmina própria da endocérvice e em
3 escassez na vagina (Cohen & Anderson, 1999). Entretanto, ao contrário da resposta humoral
4 do pulmão e intestino, há um predomínio de IgG ao invés da IgA no trato genital (Johansson
5 & Lycke, 2003).

6 Tem sido documentado, que outros mecanismos participam na resposta imune
7 humoral, tais como produção de moléculas antimicrobianas tais como lisozimas, lactoferrinas,
8 inibidor da serina leucócito protease, alfa- e beta-defensinas produzidas pelo epitélio celular e
9 outros locais no trato genital feminino (Johansson & Lycke, 2003).

10 A imunidade mediada por células (CMI) em mulheres sem inflamação é mediada por
11 células T (predominantemente células T CD8+) e células apresentadoras de antígenos (APC),
12 os quais estão prevalentemente localizados na zona de transformação (TZ) e ectocérvice. Em
13 contraste, na mucosa vaginal normal há poucas células T e APCs (Pudney *et al.*, 2005).

14 Dentre as APCs, as células de Langerhans são as principais células responsáveis pela
15 resposta imune cutânea e das mucosas no baixo trato genital feminino. As células de
16 Langerhans são células dendríticas especializadas, e uma vez processado o antígeno, elas
17 migram para fora do epitélio até uma região rica em células T nos linfonodos e apresentam o
18 antígeno processado, induzindo assim a resposta imune primária (Taube *et al.*, 2007).

19 Não está bem estabelecido qual o primeiro local de infecção no trato genital feminino
20 pelo HIV-1+. Pudney *et al.* (2005) sugerem ser a cérvice o primeiro local de infecção por este
21 vírus, e inflamação neste local aumenta o risco de transmissão do HIV, uma vez que cervicites
22 e vaginites aumentam o número de linfócitos CD8+ e CD4+ intraepiteliais e também de
23 APCs.

24 Clinicamente, infecções por HIV estão associadas com um aumento na incidência e
25 persistência da infecção por HPV, o qual por sua vez está associado com um aumento na lesão

1 intraepitelial escamosa de alto grau e câncer cervical invasivo (Vermud *et al.*, 1991; Sun *et*
2 *al.*, 1997).

3 Mulheres infectadas pelo HIV apresentam um aumento de 16 vezes do condiloma
4 venéreo e neoplasia intraepitelial, e um aumento de 3,3 vezes na recorrência e persistência da
5 neoplasia intraepitelial vulvar quando comparados com mulheres HIV negativo (Conley *et al.*,
6 2002; Korn *et al.*, 1996).

7 O subtipo HIV-2 é geralmente menos patogênico do que o HIV-1, na verdade, parece
8 ser uma forma atenuada deste último subtipo (Reeves & Doms, 2002). Indivíduos infectados
9 com HIV-2 geralmente têm um longo período de latência clínica (10 anos ou mais),
10 resultando numa taxa de mortalidade duas vezes menor quando comparados com os
11 indivíduos infectados pelo HIV-1 (Marlink *et al.*, 1994; Whittle *et al.*, 1994). Isto pode ser
12 atribuído à baixa virulência, menor declínio da contagem de células CD4, menor carga viral
13 plasmática e um melhor controle imune da replicação associado com HIV-2 relativo ao HIV-1
14 (Gottlieb *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2004).

15 Rowhani-Rahbar *et al.* (2007) demonstraram que pacientes HIV positivo apresentam
16 uma redução de 69% do clearance da infecção por HPV comparados com pacientes HIV
17 negativo, e dentre os pacientes HIV positivo, aqueles contaminados com o subtipo HIV-2
18 apresentaram um clearance do HPV mais efetivo quando comparados com pacientes
19 contaminados com o subtipo HIV-1, no entanto, essa associação foi significativamente
20 atenuada quando considerou-se a contagem de células CD4 .

21 O IARC (International Agency for Research on Câncer) relata que o uso de
22 contraceptivos orais é um fator de risco para o câncer cervical em mulheres HPV positivo
23 (Syrjänem *et al.*, 2006). Rezza *et al.* (1997) verificaram um aumento da lesão intraepitelial
24 escamosa em pacientes HIV positivo que usavam contraceptivos orais. Essa tendência pode
25 ser atribuída a um comportamento sexual diferente entre usuárias de contraceptivo oral, que

1 muitas vezes abandonam o uso de preservativos e com isso aumenta a transmissão de outros
2 microrganismos sexualmente transmissíveis tais como *Clamidia trachomatis*, o qual tem sido
3 relacionado em alguns estudos com aumento da persistência da infecção por HPV.

4 Indivíduos infectados com HIV constituem um grupo com maior predisposição a
5 co-infecções diversas. A sobrevivência de pacientes infectados pelo HIV-1 é relacionada à
6 prevenção e ao tratamento eficazes de infecções oportunistas.

7 O Papiloma Vírus Humano (HPV) tem recebido destaque uma vez que o vírus,
8 pode acarretar câncer de colo de útero e anal. Tem sido relatada a importância do profissional
9 de saúde intensificar o sistema de cuidado para o diagnóstico do HPV.

10 A co-infecção HIV / HPV pode diminuir o tempo da doença, aumentando as
11 chances do desenvolvimento de câncer. Como estratégia de diagnóstico, a indicação é a
12 realização de Papanicolau de 6 em 6 meses. Se o segundo exame for negativo, ele passa a ser
13 repetido apenas anualmente. A colposcopia é indicada apenas quando aparecerem células
14 atípicas no papanicolau. Também tem sido verificado aumento significativo do número de
15 casos de câncer anal em homens que fazem sexo com homens nos Estados Unidos infectados
16 pelo HPV. “A maioria das infecções é assintomática e não visível”. A incidência de câncer
17 anal e cervical em pessoas soropositivas é duas vezes maior, comparado às pessoas não
18 infectadas pelo HIV. É suposto que o HPV induz mudanças nas células. Há maior prevalência
19 de câncer de colo uterino entre mulheres negras americanas. A infecção pelo HPV em
20 mulheres grávidas pode gerar a contaminação da cavidade oral do bebê.

21 É amplamente documentado o maior risco de mulheres com imunossupressão
22 desenvolverem neoplasia intra-epitelial escamosa e neoplasia invasiva do trato genital. As
23 mulheres infectadas pelo HIV estão sob particular risco de desenvolvimento de neoplasias do
24 trato genital associadas ao HPV. Além disso, são reconhecidas as elevadas taxas de infecção
25 ano-genital pelo HPV e de neoplasias intra-epiteliais anais em homossexuais masculinos

1 infectados pelo HIV, bem como um aumento da frequência de carcinoma anal invasivo entre
2 estes pacientes.

3 A imunossupressão associada ao HIV acelera ou modifica o curso clínico
4 habitualmente indolente da doença cervical causada pelo HPV. Este efeito pode variar de
5 acordo com o nível de disfunção imune, agravando-se nos casos de imunodeficiência mais
6 avançada. Portanto, o rastreamento e acompanhamento das pacientes infectadas pelo HIV é
7 essencial para que lesões precursoras intra-epiteliais sejam tratadas, evitando sua progressão
8 para doença cervical invasiva.

9

10

11

12

1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 2
3
4 -Becker T.M., Wheeler C.M., McGough N.S., Jordan S.W., Dorin M., Miller J. Cervical
5 papillomavirus infection and cervical dysplasia in Hispanic, Native American, and non-
6 Hispanic white women in New Mexico. *American Journal of Public Health*. 1991;81:582-
7 586.
8
9 -Cohen M.S., Anderson D.J. Genitourinary mucosal defenses. In: Holmes KK, Sparling TF,
10 Mardh PA, Lemoy SM, (eds), *Sexually Transmitted Diseases*. New York: McGraw-Hill;
11 1999:173-190.
12
13 -Conley LJ., Ellerbrock TV, Bush TJ. ChiassonMA, Sawo D, Wright TC. HIV-1 infection and
14 risk of vulvovaginal and perianal condylomata acuminata and intraepithelial neoplasia: a
15 prospective cohort study. *Lancet*, 2002; 359: 108.
16
17 -de Villiers E.M., Papillomavirus and HPV typing. *Clinics in Dermatology*, 1997; 15:199-
18 206.
19
20 -de Villiers E.M., Wagner D., Schneider A., Wesch H., Munz F., Miklaw H., zur Hausen H.
21 Human papillomavirus DNA in women without and with cytological abnormalities: results of
22 a 5-year follow-up study. *Gynecologic Oncology*. 1992; 44:33-39.
23
24 -DiSaia P.J., C.W. *Clinical gynecologic oncology*, 1997, St Louis: Mosby.
25
26 -Gottlieb GS, Sow PS, Hawes SE, et al. Equal plasma viral loads predict a similar rate of
27 CD4+ T cell decline in human immunodeficiency virus (HIV) type 1- and HIV-2-infected
28 individuals from Senegal, West Africa. *J Infect Dis*. 2002; 185:605-914.
29
30 -Johansson M, Lycke NY. Immunology of the human genital tract. *Curr Opin Infect Dis*.
31 2003; 16:43-49.
32
33 -Kiviat N.B. & Koutsky L.A., Specific human papillomavirus type as the causal agents of
34 most cervical intraepithelial neoplasia: implications for current views and treatment. *The*
35 *Journal of the National Cancer Institute*, 1993; 85: 934-935
36
37 -Korn AP, Abercrombie PD, Foster A. Vulvar intraepithelial neoplasia in women infected
38 with human immunodeficiency virus-1. *Gynecol Oncol*, 1996; 60:500.
39
40 -Lowy D.R., Kirnbauer R., Schiller J.T. Genital Human papillomavirus infection. *National*
41 *Academy of Sciences*. 1994; 91: 2436-2440.
42
43 -Marlink R, Kanki P, Thior I, et al. Reduced rate of disease development after HIV-2
44 infection as compared to HVI-1. *Science*. 1994; 265: 1587-1590.
45
46 -Munger K., Baldwin A., Edwards K.M., Hayakawa H., Nguyen C.L., Owens M., Grace M.,
47 Huh K. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol*. 2004; 78:11451-
48 11460.

- 1
2 -Munoz N., Bosch F.X., de Sanjose S., Herrero R., Castellsague X., Shah KV., Snijeders P.J.,
3 Meijers C.J., Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with
4 cervical cancer. *The New England journal of Medicine*, 2003; 348: 518-527.
5
6 -Pudney J., Quayle A.J., Anderson D.J., Immunological Microenvironments in Human
7 Vagina and Cervix: Mediators of Cellular Immunity are Concentrated in the Cervical
8 Transformation zone. *Biology of Reproduction*, 2005; 1253-1263.
9
10 -Reeves JD, Doms RW. Human immunodeficiency virus type 2. *J Gen Virol*. 2002; 83:1253-
11 1265.
12
13 -Rezza G, Giuliani M, Branca M, Benedetto A, Migliore G, Garbuglia AR, D'Ubaldo C,
14 Pezzotti P, Capiello G, Pomponi Formiconi D, Suligo B, Schiesari A, Ippolito G, Giacomini
15 G. Determinants of squamous intraepithelial lesions (SIL) on Pap smear: the role of HPV
16 infection and of HIV-1-induced immunosuppression. *Eur J Epid*. 1997; 13:937-943.
17 Rizzardi GP, Pantaleo G. The immunopathogenesis of HIV-1 infection. In: Polsky BW,
18 Clumeck N. *HIV and AIDS*. London: Mosby-Wolfe Medical Communications; 1999: 6.1-
19 6.12.
20
21 -Richart R.M., Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Pathology Annual*, 1973; 8:301-328.
22
23 -Robbins S.L., Cotran R.S., Kumar V., Abbas A.K., Fausto N., *Patologia – Bases Patológicas*
24 *das Doenças*, 2005, editora Elsevier, 7ª edição, Rio de Janeiro, 1592 páginas.
25
26 -Rowhani-Rahbar A, Hawes SE, Sow PS, Toure P, Feng Q, Dem A, Dembele B, Critchlow
27 CW, N'Doye I, Kiviat NB. The impact of HIV Status and type on the clearance of human
28 papillomavirus infection among Senegalese women. *J Inf Dis*. 2007; 196:887-894.
29
30 -Schiffman M., Castle P.E., Jeronimo J., Rodriguez A., Wacholder S. Human papillomavirus
31 and cervical cancer. *Lancet*. 2007; 370:890-907.
32
33 -Schiffman M.H. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus
34 infection and cervical neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute*. 1992;84:394-398.
35
36 -Smith J.S., Lindsay L., Hoots B. et al. Human papillomavirus type distribution in invasive
37 cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007;
38 121: 621-632.
39
40 -Sinal S.H. & Woods C.R. Human Papillomavirus infections of the genital and respiratory
41 tracts in young children. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2005; 16:306-316.
42
43 -Sun XW, Kuhn L, Ellerbrock TV, Chaisson MA, Bush TJ, Wright TC. Human
44 papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. *New*
45 *England Journal of Medicine*, 1997; 337:1343.
46
47 -Syrjänen K, Shabalova I, Petrovichev N, Kozachenko V, Zakharova T, Pajanidi J, Podistov J,
48 Chemeris G, Sozaeva L, Lipova E, Tsidaeva I, Ivanchenko O, Pshepurko A, Zakharenko S,
49 Nerovjna R, Kljukina L, Erokhina O, Branovskaja M, Nikitina M, Grunberga V, Grunberg A,
50 Juschenko A, Santopietro R, Cintonino M, Tosi P, Syrjanen S. Oral contraceptives are not an

1 independent risk factor for cervical intraepithelial neoplasia or high-risk human
2 papillomavirus infections. *Anticancer Res.* 2006; 26: 4729-4740.

3
4
5 -Solomon D., Davey D., Kurman R., Moriarty A., O'Connor D., Prey M., Raab S., Sherman
6 M., Wilbur D., Wright T., Jr & Young N., The 2001 Bethesda System: terminology for
7 reporting of cervical cytology. *Jama*, 2002; 287: 2114-2119.

8
9 -Taube J.M., Nichols A.D., Bornman L.S., Bornman D.M., Jackson J.B. Langerhans cell
10 density and high-grade vulvar intraepithelial neoplasia in women with human
11 immunodeficiency virus infection. *J Cuta Pathol.* 2007; 34:565-570.

12
13 -Vermud SH, Kelly KF, Klein RS, et al. High risk of human papillomavirus infection and
14 cervical squamous intraepithelial lesions among women with symptomatic human
15 immunodeficiency virus infection. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1991;
16 165:392.

17
18 -Wittle H, Morris J, Todd J, et al. HIV-2 infected patients survive longer than HVI-1 infected
19 patients. *AIDS.* 1994; 8: 1617-1620.

20
21 -World Health Organization, Human Papillomavirus and HPV vaccines: Technical
22 information for policy-makers and health professionals, 2007.

23
24 -Zheng NN, Kiviat NB, Sow PS, et al. Comparison of human immunodeficiency virus (HIV)-
25 specific T-cell responses in HIV-1 and HIV-2-infected individuals in Senegal. *J Virol.* 2004;
26 78:13934-13942.

27
28 -Zheng B., Wiklund F., Gharizadeh B., Sadat M., Gambelunghe G., Hallmans G., Dillner
29 J., Wallin K., Genetic polymorphism of Chemokines receptors CCR2 and CCR5 in Swedish
30 cervical cancer patients. *Anticancer Research* 2006; 26:3669-3674.

31