



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LUIS FERNANDO LASARO MANGIERI

**PREVALÊNCIA DO HPV EM MULHERES DA REGIÃO  
NORTE DO PARANÁ E INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO  
RS333 DO GENE CCR5 NA INFECÇÃO E  
DESENVOLVIMENTO DE LESÕES INTRAEPITELIAIS  
CERVICAIS**

LUIS FERNANDO LASARO MANGIERI

**PREVALÊNCIA DO HPV EM MULHERES DA REGIÃO  
NORTE DO PARANÁ E INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO  
RS333 DO GENE CCR5 NA INFECÇÃO E  
DESENVOLVIMENTO DE LESÕES INTRAEPITELIAIS  
CERVICAIS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de doutor.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Karen Brajão de Oliveira

Londrina  
2017

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

M277p Mangieri, Luis Fernando Lasaro.

Prevalência do HPV em mulheres da região norte do Paraná e influência do polimorfismo rs333 do gene CCR5 na infecção e desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais / Luis Fernando Lasaro Mangieri. – Londrina, 2018. 93 f. : il.

Orientador: Karen Brajão de Oliveira.

Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Vírus do papiloma – Teses. 2. Colo uterino – Câncer – Teses. 3. Quimiocinas. 4. Polimorfismo (Genética) – Teses. 5. Fatores de risco – Teses. I. Oliveira, Karen Brajão de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-092

*Bibliotecária: Aparecida de Lourdes Mariani – CRB-9/1230*

LUIS FERNANDO LASARO MANGIERI

**PREVALÊNCIA DO HPV EM MULHERES DA REGIÃO NORTE DO  
PARANÁ E INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO RS333 DO GENE  
CCR5 NA INFECÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE LESÕES  
INTRAEPITELIAIS CERVICAIS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karen Brajão de Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Angelica Ehara Watanabe  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Marla K. Amarante  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Lucia Hideko Tatakihara  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Dr<sup>a</sup>. Carolina Batista Ariza  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 01 de junho de 2017.

À minha orientadora Profa. Dra. Karen Brajão  
de Oliveira, quem muito me ajudou com seus  
conhecimentos e paciência no desenvolvimento  
deste trabalho.  
Meu muito obrigado.

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Karen Brajão de Oliveira por toda a orientação na execução deste trabalho. Atenção gentil dispensada em todos os momentos de convivência. A transmissão de conhecimentos para engrandecer a elaboração e construção da pesquisa. A sua ética, alegria e bom humor sempre no convívio de trabalho. Compreensão da minha ausência quando necessária.

À Profa. Dra. Maria Angélica Ehara Watanabe pela atenção que me recebeu no laboratório no início desta jornada. Aos conhecimentos adquiridos e ao agradável convívio durante todo este tempo.

Ao colega e amigo Kleber Paiva Trugilo pelos ensinamentos passados ao longo deste estudo. Convívio agradável no laboratório e fora deste. A paciência em ouvir minhas dificuldades e ajudar. Quero lhe agradecer muito por tudo.

A colega e amiga Nádia Calvo Martins Okuyama que sempre atendeu e respondeu aos pedidos de socorro. Soube parar e ouvir também as minhas dificuldades às vezes. Também quero lhe agradecer.

Ao colega e amigo Fernando César dos Santos quem auxiliou neste trabalho com conhecimentos e opiniões para sempre melhorar. Convívio agradável e descontraído no ambiente de trabalho.

Aos demais colegas e amigos Érica Romão Pereira, Guilherme Cesar Martelossi Cebinelli, Michelle Mota Sena e Nathália Tatakihara agradeço imensamente pelo convívio no laboratório e pelos conhecimentos adquiridos no auxílio a pesquisa.

Ao secretário de pós-graduação, Sr. Sérgio Sesti por toda sua atenção depositada às dificuldades burocráticas que apareceram e me ajudou prontamente. Por me atender sempre solicito às minhas dúvidas e me auxiliar. Meu muito obrigado.

A todos os professores que me passaram conhecimentos valiosos durante estes anos. A importância de atentar a fazer pesquisa séria e ética. A ser realmente um pesquisador. Nunca os esquecerei.

Aos colegas que convivi todo este tempo nos cursos de pós-graduação, quero agradecer enormemente a todos que ajudaram direta e indiretamente. Mesmo exausto dediquei-me ao máximo para adquirir conhecimentos e não desapontá-los.

Ao Prof. Dr. Élbens M. M. Azevedo, responsável pelo ambulatório de Oncologia

Pélvica em Ginecologia e Patologia do Trato Genital Inferior do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário (AEHU), meu muito obrigado na coleta do material e seleção de pacientes.

Ao CISMENPAR, nas figuras dos Drs. Pedro H. Issamo, Regina Iria, Nelson M. Ribeiro e Priscila G. Figueiredo minha gratidão na coleta de material.

Às enfermeiras Fernanda Naldi e Fernanda Teodoro que prontamente ajudaram na coleta de material nas Unidades Básicas de Saúde. Profissionais incríveis e de uma atenção ímpar para com toda equipe da pesquisa.

Ao PPSUS pelo financiamento deste trabalho.

A todas as pacientes que gentil e atenciosamente se disponibilizaram para esta pesquisa.

Meu muito obrigado.

### **AGRADECIMENTOS À FAMÍLIA**

Agradeço aos meus filhos, Fernando e João Luiz pela compreensão da minha ausência. “Tudo, tudo por eles...” Amo muito vocês.

À minha esposa, amiga e companheira Adriana, que soube me incentivar em vários momentos e sempre esteve ao meu lado. Te amo muito.

Ao meu Pai, Fernando Mangieri Sobrinho que foi sempre meu maior inspirador e incentivador em engrandecer meus conhecimentos. Exemplo de caráter, honestidade, ombridade e profissionalismo.

À minha mãe Maria de Lourdes Lázaro Mangieri, “Maria, mãe de Jesus”, Com sua calma e serenidade soube me confortar nos momentos difíceis e orientar nas decisões.

Às minhas irmãs, Luciana e Vanessa que me ajudaram a suprir minha ausência no convívio familiar.

À minha especial tutora Profa. Karen Brajão de Oliveira que sempre esteve ao meu lado. Alegria em pessoa.

MANGIERI, Luis Fernando Lasaro. **Prevalência do hpv em mulheres da região norte do paraná e influência do polimorfismo rs333 do gene CCR5 na infec o e desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais**. 2018. 99f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

A infec o pelo Papilomavírus Humano (HPV) pode levar ao desenvolvimento de lesões epiteliais cervicais e ao câncer cervical. A região metropolitana de Londrina   o segundo maior aglomerado urbano do Paraná, e a maior demanda de cuidados de saúde na região Norte do Estado. Dados epidemiológicos sobre a ocorrência de HPV no Paraná são escassos. A maioria das infec es cervicais de HPV   eliminada pela resposta imunológica mediada por células dentro de 1-2 anos e sabe-se que a inflama o cr nica predispõe   progressão das lesões e ao desenvolvimento do tumor. Neste contexto, destaca-se o receptor 5 de quimiocina CC (CCR5) que está envolvido na quimiotaxia de leucócitos, colaborando para a resposta imunológica, cujo gene apresenta um polimorfismo na região codificadora, denominado rs333, caracterizado pela dele o de 32 pares de bases, resultando em um receptor não funcional. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência da infec o pelo HPV e anormalidades citológicas e investigar fatores predisponentes potenciais, tais como características sociodemográficas, de comportamento sexual, antecedentes ginecológicos e obstétricos, bem como investigar a associa o do polimorfismo rs333 do *CCR5* com a infec o pelo HPV e com o desenvolvimento de lesões intraepiteliais escamosas. No primeiro estudo amostras cervicais foram examinadas para a presença de DNA do HPV por rea o em cadeia da polimerase (PCR) de 429 mulheres divididas em dois grupos: não infectadas ( $n = 219$ , controles) e mulheres infectadas ( $n = 210$ ). A suscetibilidade   infec o pelo HPV foi avaliada em rela o aos dados dos potenciais fatores predisponentes. Uma maior propor o de mulheres infectadas pelo HPV foi observada entre mulheres menores de 25 anos de idade ( $p < 0,001$ ), solteiras ( $p < 0,001$ ), com renda mensal de até um s lario mínimo ( $p = 0,018$ ), fumantes ( $p = 0,014$ ), que tiveram sua primeira rela o sexual antes dos 18 anos de idade ( $p = 0,012$ ), que tiveram pelo menos quatro parceiros sexuais ao longo da vida ( $p < 0,001$ ) e que não estavam grávidas ( $p = 0,008$ ). A análise de regressão logística binária multivariada mostrou que a idade inferior a 25 anos aumentou a susceptibilidade para infec o em cerca de 4 vezes (OR = 4,92, IC95% = 1,67-14,52,  $p = 0,004$ ) e em rela o ao estado civil, casadas ou que possuam parceiro civil (OR = 0,45; IC95% = 0,23 - 0,88;  $p = 0,020$ ) e que declararam renda mensal de 1 a 3 s larios mínimos (OR = 0,59; IC95% = 0,36 - 0,95;  $p = 0,030$ ) apresentaram prote o contra a infec o pelo HPV. O grupo HPV positivo foi analisado quanto   presença de lesões intraepiteliais escamosas (LIE). As LIE foram mais frequentes em mulheres que fumavam ( $p = 0,017$ ), com até um s lario mínimo mensal ( $p = 0,019$ ) e que sofreram abortos espontâneos ( $p = 0,042$ ). A análise de regressão logística binária mostrou que a renda mensal variando de 1 a 3 s larios mínimos   um fator protetor para o desenvolvimento de LIE em pacientes com HPV (OR = 0,49; IC95% = 0,26 - 0,93;  $p = 0,028$ ) enquanto uma renda mensal inferior a 1 s lario mínimo caracterizou risco. No segundo estudo foi realizado a genotipagem do rs333 de *CCR5* de 164 mulheres infectadas com HPV e 185 mulheres não infectadas. Quanto   distribu o

genotípica e alélica de CCR5, não foi observada diferença significativa em relação à infecção pelo HPV. O genótipo CCR5/CCR5 foi observado em 94,1% das mulheres não infectadas pelo HPV e em 89% das infectadas, CCR5/Δ32 em 5,9% das infectadas pelo HPV e em 10,4% das mulheres não infectadas, e Δ32/Δ32 foi observado em apenas uma (0,6%) paciente infectada. Os genótipos de CCR5 também não foram associados ao desenvolvimento de lesões cervicais entre mulheres infectadas pelo HPV ( $p = 0,167$ ). Em conclusão, os resultados sugerem que a idade, o estado civil e a renda mensal são cofatores importantes para a infecção pelo HPV e desenvolvimento da LIE na região Norte do Paraná. Contudo devido ao fato do rs333 do *CCR5* ser um polimorfismo pouco frequente na população, bem como devido ao importante papel deste receptor na resposta imune antiviral e antitumoral, mais estudos são necessários, para estabelecer o papel do CCR5 na infecção pelo HPV e no desenvolvimento de lesões intraepiteliais escamosas.

**Palavras-chave:** Câncer cervical. Lesões intraepiteliais escamosas. Fatores de risco. Receptores de quimiocinas. CCR5.

MANGIERI, Luis Fernando Lasaro. **HPV prevalence in women in the northern region of paraná and CCR5 gen rs333 polymorphism influence in the infection and squamous intraepithelial lesions development.** 2018. 99 p. Thesis (Doctoral Experimental Pathology) -Department of Pathological Science, Center of Biological Science, State University of Londrina. 2018.

## ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) infection can lead to the development of cervical epithelial lesions and cervical cancer. The metropolitan region of Londrina is Paraná's second largest urban agglomerate, and the highest demand for health care in the Northern region of the state. Epidemiological data on the HPV occurrence in Paraná are scarce. Most HPV cervical infections are eliminated by the cell-mediated immune response within 1-2 years and it is known that chronic inflammation predisposes to the progression of the lesions and the tumor development. In this context we highlight the CC chemokine receptor 5 (CCR5) which is involved in leukocyte chemotaxis, controlling the immunological response, its gene may present a polymorphism in the coding region, designated rs333, characterized by the deletion of 32 base pairs, resulting in a non-functional receptor. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the occurrence of HPV infection and cytological abnormalities and to investigate potential predisposing factors, such as sociodemographic characteristics, sexual behavior, gynecological and obstetric history, as well as to investigate the association of rs333 polymorphism of the chemokine receptor CCR5 with HPV infection and the development of squamous intraepithelial lesions. In the first study cervical samples of 429 women were examined for the presence of HPV DNA by polymerase chain reaction (PCR). Two groups were formed: uninfected (n = 219, controls) and infected women (n = 210). Susceptibility to HPV infection was assessed according to the data of the potential predisposing factors. A higher proportion of HPV-infected women was observed among women younger than 25 years of age ( $p < 0.001$ ), single ( $p < 0.001$ ), with monthly income of up to one minimum wage ( $p = 0.018$ ), smokers ( $p = 0.014$ ), who had their first sexual intercourse before 18 years of age ( $p = 0.012$ ), that had at least four lifetime sexual partners ( $p < 0.001$ ) and that have never been pregnant ( $p = 0.008$ ). The multivariate binary logistic regression analysis showed that age less than 25 years increased the infection susceptibility by about 4 times (OR = 4.92, 95% CI = 1.67-14.52,  $p = 0.004$ ) and regarding marital status, married women or with a civil partner (OR = 0.45, CI 95% = 0.23 - 0.88,  $p = 0.020$ ) and that declared a monthly income of 1 to 3 minimum wages (OR = 0.59, CI 95 % = 0.36 - 0.95,  $p = 0.030$ ) showed protection against HPV infection. The HPV positive group was analyzed for the presence of squamous intraepithelial lesions (SIL). The SIL were more frequent in women who smoked ( $p = 0.017$ ), with up to a monthly minimum wage ( $p = 0.019$ ) and that suffered spontaneous abortions ( $p = 0.042$ ). The binary logistic regression analysis showed that monthly income ranging from 1 to 3 minimum wages is a protective factor for the development of SIL in patients with HPV (OR = 0.49, 95% CI = 0.26-0.93,  $p = 0.028$ ) while a monthly income lower than 1 minimum wage characterized risk. In the second study, CCR5 rs333 genotyping of 164 HPV-infected and 185 uninfected women was performed by the PCR technique. Concerning the genotypic and allelic distribution of CCR5, no significant difference was observed in relation to HPV infection. The CCR5/CCR5 genotype was observed in 94.1% of the

non-HPV infected women, and in 89% of those infected, CCR5/Δ32 in 5.9% of HPV-infected women and in 10.4% of uninfected women, and Δ32/Δ32 was observed in only one (0.6%) infected patient. CCR5 genotypes were also not associated with the development of cervical lesions among HPV-infected women ( $p = 0.167$ ). In conclusion, the results suggest that age, marital status and monthly income are important factors for HPV infection and development of SIL in the Northern region of Paraná. However due to the fact that CCR5 rs333 is a not very common polymorphism in the population, as well as due to the important role of this receptor in the antiviral and antitumor immune response, more studies are needed to establish the role of CCR5 in HPV infection and in the squamous intraepithelial lesions development.

**Keywords:** Cervical cancer. Squamous intraepithelial lesions. Risk factors. Chemokine receptors. CCR5.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP	Adenosine triphosphate
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
°C	Celsius Grade
CCL3	Chemokine Ligand (family CC) 3
CCL4	Chemokine Ligand (family CC) 4
CCL5	Chemokine Lingad (family CC) 5
CCR2	Chemokine Receptor (family CC) 2
CCR5	Chemokine Receptor (family CC) 5
CISMEPAR	Consortio Intermunicipal de Saúde do Médio Paranapanema
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DST	Doença Sexualmente Transmissível
E2F	E2 promoter-binding factor
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EHW	Equilíbrio de Hardy Weinberg
ER	Estrogen Receptor
ERE	Elemento Responsivo ao Estrógeno
h	Horas
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPV	Human Papillomavirus
HPV-AR	HPV de alto risco
HPV-BR	HPV de baixo risco
HR-HPV	High Risk - HPV
HU	Hospital Universitário
IFN	Interferons
IFN- $\gamma$	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina

LCR	Long Control Region
LIE	Lesão Intraepitelial Escamosa
LIEAG	Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau
LIEBG	Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau
MCP-3	Monocyte Chemotatic Protein 3
mg	Miligrama
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minutos
MIP1	Macrophage Inflammatory Protein 1
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
NK	Natural Killer
g	Micrograma
L	Microlitro
µm	Micrometro
nm	Nanômetro
NCBI-NIH	National Center for Biotechnology Information - National Institutes of Health
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Open Reading Frame
p53	Tumor supressor protein 53
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
pRB	Proteína do retinoblastoma
RANTES	Regulated Upon Activation Normal T-cells Express Sequence
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Rotações por minuto
s	segundos
SDF1	Stromal cell-derived Factor 1
Th	T helper
UICC	Union for International Cancer Control
V	Volts

WHO World Health Organization

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> -	Receptor de Quimiocina 5 (CCR5).....	28
<b>Figura 2</b> -	Perfil Eletroforético para detecção do DNA do Vírus HPV .....	36
<b>Figura 3</b> -	Perfil Eletroforético para detecção do DNA de <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	37
<b>Figura 4</b> -	Sequência de nucleotídeos obtida pelo sequenciamento direto de produto de PCR positivo para HPV .....	38
<b>Figura 5</b> -	Sequência de nucleotídeos obtida pelo sequenciamento direto de produto de PCR positivo para <i>C. trachomatis</i> .....	39
<b>Figura 6</b> –	Perfil Eletroforético dos três possíveis genótipos do receptor de quimiocina 5 .....	40

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1	HPV .....	16
1.1.1	Estrutura Molecular do Vírus HPV .....	16
1.1.2	Patogênese da Infecção pelo HPV .....	17
1.2	Fatores de Risco .....	20
1.2.1	Papel da Co-Infecção HPV / <i>Chlamydia Trachomatis</i> no Desenvolvimento de Lesões .....	22
1.3	Microambiente inflamatório e o desenvolvimento de lesões e do câncer cervical .....	25
1.3.1	Quimiocinas e seus Receptores .....	26
1.3.2	Receptor de Quimiocina CCR5 .....	28
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	32
2.1	Objetivo Geral.....	32
2.2	Objetivos Específicos .....	32
2.2.1	Artigo 1 .....	32
2.2.2	Artigo 2 .....	32
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	34
3.1	Aspectos Éticos .....	34
3.2	Seleção e Caracterização das Amostras.....	34
3.3	Extração de DNA.....	35
3.4	Diagnóstico Molecular de HPV .....	35
3.4.1	Amplificação de Sequências de Nucleotídeos do HPV .....	35
3.4.2	Amplificação de Sequência de Nucleotídeos do Gene <i>beta-globina</i> Humana .....	36

3.5	Diagnóstico Molecular de <i>C. trachomatis</i> .....	37
3.6	Sequenciamento de Amostras Positivas para HPV e <i>Chlamydia tra-</i> <i>chomatis</i> .....	38
3.7	Análise do Polimorfismo rs333 de <i>CCR5</i> .....	40
3.8	Análise Estatística .....	41
<b>4</b>	<b>PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>43</b>
4.1	Artigo 1 .....	43
4.2	Artigo 2 .....	60
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES DOS ARTIGOS</b> .....	<b>77</b>
5.1	Artigo 1 .....	77
5.2	Artigo 2 .....	77
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>79</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>80</b>
	<b>APÊNDICE</b> .....	<b>92</b>
	<b>APÊNDICE A - Questionário Socio-Demográfico</b> .....	<b>93</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>94</b>
	<b>ANEXO A - Submissão e aprovação no Comitê de Ética em Pes-</b> <b>quisa em Seres Humanos UEL</b> .....	<b>95</b>
	<b>ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</b> .....	<b>95</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Papilomavírus Humano (HPV) é considerado um importante agente etiológico sexualmente transmissível (TAQUETTE; VILHENA; PAULA, 2004), podendo ser transmitido pelo contato com a pele ou mucosa infectada, preferencialmente durante as relações sexuais e também pelo simples contato íntimo do casal. Atualmente, as infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) são consideradas um dos principais problemas de saúde pública no mundo. O início precoce das relações sexuais acompanhada de um maior número de parceiros, observada na população atual, contribui para a manutenção dos altos níveis de incidência das principais ISTs dentre a população. A infecção pelo HPV é considerada atualmente a IST com maior prevalência mundial (DOCHEZ et al., 2014).

Já foram identificados mais de 200 tipos de HPV (BZHALAVA; EKLUND; DILLNER, 2015), sendo 40 conhecidos por infectarem o trato anogenital, dando origem a verrugas genitais ou lesões neoplásicas. A infecção por HPV de alto risco é considerada o principal fator causador de lesões intraepiteliais escamosas (LIE) bem como do câncer cervical (ZUR HAUSEN, 2009).

O câncer de colo de útero causa milhares de mortes prematuras em mulheres, principalmente naquelas com menores condições sócio econômicas (SAY et al., 2014), sendo o quarto tipo de câncer mais frequente entre mulheres no mundo, com uma incidência de 528 mil casos em 2012 (GLOBOCAN, 2013; TORRE et al., 2015). Na população brasileira ele ocupa o terceiro lugar, com incidência de 16.340 casos para o ano de 2016, sendo o tipo mais incidente na região norte e o quinto tipo mais incidente na região sul, podendo ser considerado um importante problema de saúde pública (INCA, 2015).

O câncer de colo uterino é uma doença multifatorial, caracterizada por uma ativação exacerbada e a manutenção de vias inflamatórias e que apresenta diversos fatores de risco, como vários parceiros sexuais, sistema imune debilitado e inflamação cervical causada por co-infecções por *Chlamydia trachomatis* ou *Neisseria gonorrhoeae* (SALES; KATZ, 2012).

Evidências epidemiológicas sugerem que a co-infecção HPV / *Chlamydia trachomatis* desempenha um papel central na etiologia da neoplasia cervical intraepi-endotelial e no desenvolvimento subsequente de câncer cervical (TAMIM et al., 2002; SAFAEIAN et al., 2010).

## 1.1 HPV

### 1.1.1 Estrutura Molecular do Vírus HPV

O HPV pertence à família Papillomaviridae, e é composto por um capsídeo proteico e um DNA circular dupla-fita (8000 pb), constituído de oito *open reading frames* (ORFs) e de uma região controladora da transcrição viral, a *long control region* (LCR). As ORFs podem ser divididas em regiões de expressão precoce (E) e tardia (L). As regiões de expressão precoce codificam as proteínas de replicação viral (E1, E2, E4, E5, E6 e E7), enquanto as de expressão tardia codificam as proteínas do capsídeo (L1 e L2) (DOORBAR, 2006; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007; KIRNBAUER et al., 1992).

As proteínas E1 e E2 estão envolvidas com o início da replicação viral. Em níveis aumentados, E2 regula negativamente E6 e E7 (HEBNER; LAIMINS, 2006), diminuindo a expressão desses oncogenes (JOHANSSON; SCHWARTZ, 2013). A proteína E4 parece contribuir para uma maior eficiência da amplificação do genoma viral e também facilitar a liberação dos vírions recém-formados (DOORBAR, 2013). A E5 é uma oncoproteína associada ao aumento do potencial de imortalização induzida por E6 e E7, à regulação positiva da via de sinalização do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), à angiogênese e ao efeito anti-apoptótico (KIM et al., 2010). As oncoproteínas E6 e E7 têm como alvo uma série de reguladores negativos do ciclo celular, principalmente p53 e pRB, respectivamente. Durante o ciclo de vida viral, E6 e E7 facilitam a manutenção estável de episomas virais e estimulam células diferenciadas a entrarem na fase S (FEHRMANN et al., 2003). As proteínas estruturais L1 e L2 são responsáveis pela formação do invólucro do vírus. L1 é o elemento estrutural primário e L2 é o componente menor do capsídeo. Ambas as proteínas são de suma importância para garantir uma eficiente infectividade viral (DOORBAR, 2006; MODIS; TRUS; HARRISON, 2002).

De acordo com seu potencial carcinogênico, os HPV podem ser classificados em dois grupos, sendo primeiro, estão os subtipos que, quando associados a outros fatores de risco, têm relação com o desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais de colo uterino, vulva, vagina e região anal, denominados de alto risco oncogênico (HPV-AR)

dentre os quais se destacam os tipos HPV16 e HPV18. E no segundo grupo estão os subtipos de baixo potencial oncogênico (HPV-BR), ex. HPV6 e HPV11, associados ao surgimento de infecções consideradas benignas como o condiloma acuminado (SCHIFFMAN et al., 2007).

### 1.1.2 Patogênese da Infecção pelo HPV

A transmissão do HPV ocorre por meio do contato entre epitélios cutâneos e entre epitélios de mucosas infectados (SCHIFFMAN et al, 2007). O vírus infecta células basais do epitélio, expostas geralmente por microlesões e o seu material genético se instala no núcleo na forma episomal. O genoma do vírus é amplificado e novas partículas vão sendo formadas para a propagação da infecção à medida que as células infectadas se diferenciam (FEHRMANN et al., 2003; FERNANDES et al., 2015; ZHENG; BAKER, 2006).

Apesar da infecção pelo HPV apresentar baixa frequência de persistência, quando esta ocorre, anormalidades na cérvix uterina são induzidas, conseqüentemente, aumentando o risco de desenvolvimento de lesões precursoras ao câncer cervical (BRAATEN; LAUFER, 2008; WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007).

A progressão para o câncer cervical, a partir de um estado pré-invasivo até o câncer invasivo propriamente dito, é um processo lento, levando anos ou até mesmo décadas para ocorrer. Uma vez que a infecção pelo HPV ocorre, este começa a se replicar e a induzir alterações displásicas na célula hospedeira, as quais podem levar ao desenvolvimento de lesões intraepiteliais escamosas consideradas lesões precursoras pré-malignas (RAMAKRISHNAN; PARTRICIA; MATHAN, 2015). Ao longo do tempo, a classificação dessas lesões evoluiu, com distintos termos sendo adotados por diferentes sistemas de classificação, tanto histológicos quanto citológicos, os quais evoluíram separadamente. Enquanto a classificação histológica caracteriza o processo neoplásico e auxilia no tratamento, a citologia tem papel importante na prevenção do câncer cervical (SCHIFFMAN; SOLOMON, 2013).

Durante a fase pré-maligna, as anormalidades encontradas no exame histopatológico caracterizam o grau de severidade dessas lesões, chamadas de neoplasias intraepiteliais cervicais grau 1, 2 ou 3 (NIC 1, 2 ou 3), enquanto a

classificação citológica, segue o sistema Bethesda, o qual considera dois graus distintos de LIE, incluindo as lesões intraepiteliais escamosas de baixo (LIEBG) ou alto grau (LIEAG). Atualmente há uma correspondência entre os dois sistemas sendo NIC1 (displasia leve) correspondente a LIEBG; enquanto NIC2 (displasia moderada) e NIC3 (displasia severa/carcinoma *in situ*) são consideradas LIEAG (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007).

Cerca de 80% das mulheres serão infectadas pelo HPV durante sua vida, no entanto a maioria (80-90%) das infecções é eliminada sem causar lesões cervicais (DOORBAR et al., 2012). A persistência viral pode acarretar lesões cervicais, das quais, cerca de 75% das LIEBG são elucidadas ou podem progredir para LIEAG, o que pode levar ao desenvolvimento do câncer de colo de útero invasivo, em aproximadamente 10% das mulheres com persistência da infecção viral (JIT et al., 2010; TORRES-POVEDA et al., 2014).

Segundo Doorbar (2005), o ciclo vital da infecção pelo HPV passa por cinco etapas consecutivas: infecção, manutenção do genoma, fase proliferativa, amplificação genômica e síntese de partículas virais. Assim após a infecção, acredita-se que o vírus mantenha seu genoma com baixo número de cópias sob a forma episomal nas células da camada proliferativa, principalmente em células de reserva presentes em áreas de metaplasia. Nesta fase há um baixo nível de expressão dos genes E6, E7, E1 e E2, suficiente para manutenção genômica do vírus.

Com a amplificação do genoma do HPV existe a produção de partículas virais, que é dependente da expressão dos genes E6 e E7. Estas partículas montam-se nas camadas médias e superiores do epitélio cervical, para as quais há um aumento das expressões dos genes virais E1, E2, E4 e E5. Na fase final, os genes L1 e L2 codificam as proteínas virais do capsídeo viral e são expressas nos grupos de células com maior expressão do gene E4, importante na alteração da matriz intracelular, maturação e replicação do vírus (DOORBAR, 2005; SCHEURER; TORTOLERO-LUNA; ADLER-STORTHZ, 2005). A função de E4 não está bem estabelecida, sabe-se que participa tanto da fase precoce quanto tardia da infecção viral produtiva e, provavelmente, por interagir com a citoqueratina, pode estar relacionada às alterações estruturais no citoplasma das células infectadas o que leva a formação dos coilócitos – células atípicas com uma cavitação perinuclear no citoplasma que indica alterações citopáticas devidas a infecção por HPV (IARC, 2007;

STOLER, 2003). Recentemente a proteína E4 foi sugerida como um potente marcador no rastreamento de HPV (YAJID et al., 2017).

Esta organização de expressão viral no ciclo de uma infecção produtiva é semelhante para os diferentes tipos de HPV. O desenvolvimento de lesões cervicais e do câncer cervical está associado à perda da regulação deste ciclo reprodutivo do HPV, evento caracterizado pelos HPV oncogênicos (DOORBAR, 2006). Estas se caracterizam pelo aumento da fase de expressão dos genes E6 e E7 que se estende mais amplamente na espessura do epitélio, da profundidade à superfície, simultaneamente diminuição da expressão dos genes importantes nos estágios finais da infecção, fato que impossibilita que o ciclo produtivo se complete. A perda da capacidade de completar o ciclo que diferencia a infecção viral produtiva presente nas lesões de baixo grau, de uma infecção viral transformante (DOORBAR et al., 2012).

O aumento da expressão de E6 e E7 na infecção por HPV de alto risco, que leva à LIEAG, predispõe as células ao acúmulo de alterações genéticas que contribui para a progressão tumoral. Neste contexto, os baixos níveis de E6 e E7 presentes nas LIEBG não comprometem as funções de seus alvos celulares o suficiente para facilitar a progressão do tumor. A desregulação viral observada em LIEAG é facilitada pela integração dos episomas virais no cromossomo da célula hospedeira, a qual pode desregular a expressão dos genes E6 e E7, que são referidos como oncogenes virais (DOORBAR et al., 2012).

Os oncogenes virais E6 e E7 atuam em duas etapas distintas do ciclo celular: no controle da passagem da fase G1 para S e na regulação da apoptose. Uma exagerada expressão de oncogenes virais E6 e E7 nas células proliferativas favorece que a proteína E7 induza a degradação da proteína retino blastoma (pRB), que tem papel fundamental na manutenção da célula em G1, exercendo sua função por formar complexos estáveis com o fator de transcrição celular E2F (E2F). Este por sua vez, quando livre, ativa diversas quinases dependentes de ciclinas, desencadeando o processo de replicação do DNA. A inativação do pRB aumenta a proliferação celular do epitélio infectado, o que pode ser diretamente demonstrado através da detecção do antígeno nuclear associado à proliferação (Ki-67) (SINGH; JOHNSON; CHELLAPPAN, 2010).

O HPV também interfere no controle do ciclo celular e apoptose

através de produto de seu oncogene E6, o qual se liga ao produto do gene *TP53*, à proteína p53, degradando-a. Esta degradação compromete a integridade do DNA replicado, causando instabilidade cromossômica, imortalização e proliferação anormal das células transformadas, favorecendo o desenvolvimento do tumor (GANGULY; PARIHAR, 2009).

As proteínas E6 e E7 podem causar a perda da integridade dos cromossomos em nível numérico através de múltiplas vias, que inclui a desregulação da expressão gênica e mitótica, embora os mecanismos moleculares subjacentes precisem ser definidos com mais detalhes (CATTANI et al., 2009). E6 e E7 tem propriedades transformadoras. A oncoproteína E6 degrada a p53, promovendo a proliferação celular via formação do complexo trimérico entre E6, p53 e E6-AP (proteína associada a E6) (KIM et al., 2012; KHATTAK et al., 2017).

Embora a infecção pelo HPV seja o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical, sabe-se que a presença deste vírus, isoladamente, não é suficiente para causar este tipo de câncer, especialmente baseado no fato de que apenas uma minoria de mulheres infectadas por um HPV-AR desenvolve neoplasia maligna. Dessa forma, o surgimento das LIE e do câncer cervical resultam da ação conjunta de diversos fatores de risco. (DOORBAR et al., 2012; NGUYEN; RAMÍREZ-FORT; RADY, 2014).

## 1.2 FATORES DE RISCO

Estudos de coorte e corte transversal identificaram vários fatores de risco para infecção do HPV, como número de parceiros sexuais (durante toda vida e recentes), idade do início da atividade sexual, tabagismo, anticoncepcional oral, outras DST (principalmente *Chlamydia trachomatis* e herpes genital), inflamação crônica, imunossupressão e paridade (TROTTIER; FRANCO, 2006).

O número de parceiros sexuais tem sido considerado o fator de risco mais importante (FERLAY et al., 2004). Uma vez que mulheres que se relacionaram com mais parceiros em período menor de tempo, apresentaram quatro vezes mais risco de adquirir o HPV oncogênico (HO et al, 1998). Fedrizzi et al. (2008), no entanto, não encontraram diferença significativa quanto à infecção de HPV e ao número de parceiros sexuais.

Alguns fatores comportamentais, que favorecem a transmissão viral, estão associados ao maior risco de câncer cervical, especialmente aqueles associados a práticas sexuais (PLUMMER; PETO; FRANCESCH, 2012). O início precoce da primeira relação sexual, deve-se provavelmente pelo tempo de exposição ao vírus pelo contato sexual (CASTELLSAGUÉ; BOSCH; MUÑOZ, 2002), multiplicidade de parceiros sexuais (CASTELLSAGUÉ; MUÑOZ, 2003) e não uso de contraceptivos de barreira (HARIRI; WARNER, 2013; LAM et al., 2014; PIERCE CAMPBELL et al., 2013). Além da idade de início da atividade sexual, outro fator importante é a idade das pacientes, sendo observada uma alta prevalência da infecção ao início da vida sexual na adolescência assim como após os 50 anos (SANJOSÉ et al., 2007). E relacionados ao hospedeiro estão também associados à progressão de lesões cervicais e à transformação maligna, assim como a carga viral, idade, coinfeção com outros patógenos, susceptibilidade genética e estado imunológico (MOSCICKI et al., 2012; TAN; ANKATHIL, 2015).

Outro fator de risco para câncer cervical é o tabagismo, principalmente pela imunossupressão genital levando à persistência da infecção de HPV (HO et al., 1998). A relação entre tabaco e cânceres associados ao HPV é complexa. Dados epidemiológicos sugerem que o tabaco está positivamente associado a citologia cervical anormal, metaplasia, neoangiogênese, proliferação do epitélio e com expressão acentuada de p53 e Ki67 nas displasias (WILLEY et al, 2006).

Em relação à pílula anticoncepcional há muita controvérsia. Estes vírus respondem aos esteróides quando estimulados *in vitro*, ativando os oncogenes virais (KJAER et al., 2000). O uso prolongado de anticoncepcionais por mais de 10 anos, aumentaria o risco em duas vezes para câncer de colo uterino, mas essa relação parece não estar presente para infecção de HPV (FEDRIZZI et al., 2008). Sugere-se que hormônios esteroidais poderiam aumentar a transcrição de oncogenes do HPV, resultando na degradação da p53, desregulação do ciclo celular levando ao câncer cervical (MOODLEY et al., 2003; RAMACHANDRAN, 2017).

O número de gestações contribui para o aumento de risco da infecção. Possivelmente pelo estado de imunossupressão próprio da gestante e maior exposição ao epitélio de transição metaplásico, mais susceptível à infecção HPV que o epitélio maduro (FEDRIZZI et al., 2008; CASTELLSAGUÉ; MUÑOZ, 2003).

Menos do que 1% das mulheres infectadas com HPV de alto risco

desenvolverão câncer, em adição a cofatores biológicos e ambientais como status imunológico, mudanças hormonais, paridade, hábitos alimentares, uso de tabaco e co-infecção com outros agentes sexualmente transmissíveis tem sido implicados no desenvolvimento e progressão do HPV associado a cânceres, bem como *Chlamydia trachomatis* e o Herpes simples 2 (CASTELLSAGUÉ; BOSCH; MUÑOZ, 2002). Co-infecções entre o HPV e outros micro-organismos, incluindo os vírus que compartilham o mesmo nicho epitelial, poderia aumentar a replicação do HPV e sua persistência, acelerando a progressão para o câncer (GUIDRY; SCOTT, 2017). HIV bem como membros da família Herpesviridae (HSV, HCMV and EBV) e família Polyomaviridae (BKV e JCV) tem sido detectado em tumores positivos para HPV, e alguns estudos tem revelado correlações entre co-infecção e progressão da doença e/ou alterações de ciclo de vida do vírus (BIRDWELL et al., 2014; QUEEN et al., 2013; SCHLUMS et al., 2015). No entanto, outros estudos não observaram um maior risco de infecção HPV em mulheres com alguma outra DST (DEFAUX et al., 2004; FEDRIZZI et al., 2008).

### 1.2.1 Papel da Co-Infecção HPV / *Chlamydia Trachomatis* no Desenvolvimento de Lesões

Os especialistas da área da saúde vêm se preocupando com as infecções por *Chlamydia trachomatis*, não apenas por estar entre as DSTs mais comuns em todo o mundo, mas também devido ao seu caráter predominantemente assintomático que dificulta seu diagnóstico e retarda o tratamento, podendo gerar sequelas à vida reprodutiva da mulher, como por exemplo, a infertilidade (POIARES 2008).

Estima-se que a cada ano, no Brasil, haja aproximadamente 2 milhões de pessoas contaminadas por *Chlamydia trachomatis* (BRASIL, 2011), porém sua real prevalência e incidência são desconhecidos devido ao caráter assintomático da infecção (LAND et al., 2010).

A *Chlamydia trachomatis* é uma bactéria gram-negativa pertencente à família *Chlamydiaceae*, e apresenta ciclo de desenvolvimento obrigatoriamente intracelular, pois apesar de apresentar um sistema metabólico com capacidade de síntese protéica própria, utiliza o ATP produzido pelas células do hospedeiro como

fonte de energia (BLACK 1997, TOREZAN, 1999).

A transmissão desta bactéria ocorre principalmente através do contato sexual com uma pessoa infectada, porém pode ocorrer a transmissão direta durante o parto (VAZ; CECCON; DINIZ, 1999). As manifestações clínicas das infecções por *Chlamydia trachomatis* são produzidas em consequência da destruição direta das células durante a multiplicação bacteriana intracelular e da resposta inflamatória do hospedeiro (MURRAY et al., 2006).

Na mulher ocorre principalmente infecção da cérvix uterina sendo, portanto, causa comum de cervicite, onde pode disseminar-se e causar endometrite, salpingite, doença inflamatória pélvica, afetando diretamente a vida reprodutiva da mulher, e quando não tratadas podem culminar em esterilidade (MARQUES; MENEZES 2005; QUINN et al., 1996, CDC, 2016). De acordo com a WHO (2007), entre 10% e 40% das mulheres com infecção por clamídia não tratadas desenvolvem doença inflamatória pélvica sintomática, sendo que 40% a 50% das gestações ectópicas são atribuídas a esta doença, e ainda as infecções pós-lesão tubária são responsáveis por 30% a 40% dos casos de infertilidade feminina. Estudos revelam que durante a gravidez, a infecção por essa bactéria pode afetar o bem-estar do concepto e o curso da gestação, com maior possibilidade de prematuridade, ruptura precoce de membranas, baixo peso ao nascer e ainda morte perinatal, esterilidade e gravidez ectópica, além da transmissão materno-fetal durante o parto (PAAVONEN, 2012; QUINN et al., 1996).

Contudo, cerca de 70% a 80% das mulheres infectadas apresentam-se assintomáticas, dificultando o seu diagnóstico, retardando seu tratamento e contribuindo para a disseminação da bactéria. Quando sintomática pode ocorrer disúria, corrimento vaginal e sangramento após relação sexual (BLACK, 1997).

Devido ao ciclo de vida obrigatoriamente intracelular, a *Chlamydia trachomatis* não apresenta crescimento nos meios de cultura utilizados na rotina laboratorial. Seu crescimento *in vitro* é realizado em cultura de células McCoy, sendo este considerado padrão ouro para seu diagnóstico. Contudo, este método de diagnóstico é trabalhoso e exige uma alta infraestrutura laboratorial, bem como técnicos de laboratório com elevada experiência, o que torna o método demorado e de custo elevado. Como opção ao diagnóstico, técnicas de amplificação de ácidos nucléicos estão sendo incorporadas cada vez mais nos laboratórios de análises,

apresentando tempo de realização relativamente curto, comparado a outros métodos, mas principalmente devido à sua elevada sensibilidade e especificidade (HARKINS; MUNSON, 2011).

Com a introdução das metodologias de detecção molecular para bactérias causadoras de doenças sexualmente transmissíveis, o número de positividade diagnóstica tem aumentado (SPEERS, 2006), auxiliando no tratamento precoce e controle da transmissibilidade bacteriana. Dentre as metodologias de detecção molecular a PCR (*polymerase chain reaction*) é considerada método de escolha, devido à sua alta sensibilidade, especificidade e adequação para os vários tipos de amostras (MONROY; MATA; MAGDALENO, 2009).

Porém, nos serviços públicos brasileiros são raros os locais que oferecem sistematicamente a pesquisa para *C. t.* Nos serviços privados só se pesquisa em casos sintomáticos ou quando um dos parceiros sexuais está acometido. Mesmo assim, a pesquisa para a *C. t.* não faz parte da rotina da maioria dos ginecologistas, urologistas ou médicos que atendem DST, apesar de sua importância e sua possível relação com o câncer do colo uterino (CODES et al., 2002; CODES et al., 2006; FRIAS et al., 2001; MELLEES et al., 2000).

Sabe-se que a coinfeção por *C. t.* é um importante fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical e, atualmente, esta consiste na doença bacteriana sexualmente transmissível mais comum (IGIETSEME et al., 2015), afetando principalmente jovens com idade inferior a 25 anos (DEBATTISTA et al., 2002). Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), ocorrem, anualmente, mais de 100 milhões de novos casos ao redor do mundo (WHO, 2008). A prevalência de *C. trachomatis* dentro da faixa etária de 18-44 anos tem sido relatada como sendo de 1,4% para os homens e 1,6% para as mulheres, sendo que entre indivíduos com idade entre 18 e 29 anos o percentual é ainda maior, de 2,5% e 3,2%, respectivamente (QUINÓNEZ-CALVACHE et al., 2016).

Existem fortes evidências que sugerem que o HPV em conjunto com *C. t.* exercem um importante papel na etiologia da neoplasia intraepitelial cervical, e, subsequentemente, no câncer cervical (TAMIM et al., 2002), uma vez que a *C. t.* é capaz de sintetizar *heat shock proteins* 60 (HSP60), as quais tem ação anti-apoptóticas durante a infecção persistente, facilitando a atuação das oncoproteínas em células simultaneamente infectadas por HPV-AR (DI FELICE et al., 2005).

### 1.3 MICROAMBIENTE INFLAMATÓRIO E O DESENVOLVIMENTO DE LESÕES E DO CÂNCER CERVICAL

Como já mencionado, a maioria das mulheres é infectada por algum dos tipos de HPV ao longo da vida sexual e apenas uma pequena porcentagem desenvolve a doença invasiva (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007), uma vez que a maioria das infecções por HPV é resolvida pela resposta imunológica (SCHIFFMAN et al., 2007). Todavia, as infecções causadas por HPV-AR podem progredir para LIEAG ou câncer invasivo como resultado da interação do sistema imunológico com o microambiente da lesão (PATEL; CHIPLUNKAR, 2009).

O balanço dos perfis de resposta imunológica promovida por linfócitos T *helper* 1 (Th1) e *helper* 2 (Th2) é importante para a elucidação de lesões e da infecção pelo HPV. A predominância do perfil Th2 e a supressão da resposta promovida por células T regulatórias (Treg), estão associadas à progressão de lesões e ao câncer de colo do útero (CLERICI et al., 1997; DELIGEOROGLOU et al., 2013; KOBAYASHI et al., 2005; STEELE et al., 2005).

Os linfócitos T citotóxicos (CTL) e as células *Natural Killer* (NK) desempenham papel efetor contra as células infectadas pelo HPV, e sua presença no microambiente inflamatório está correlacionada à elucidação da infecção e das lesões (SASAGAWA; TAKAGI; MAKINODA, 2012).

Neste cenário, a inflamação crônica resultante possui papel fundamental na tumorigênese, contribuindo com a iniciação do tumor através da produção de estresse genotóxico, com a promoção, pela indução de proliferação celular, e com a progressão, por aumentar a angiogênese e invasão tecidual (CHOW; MÖLLER; SMYTH, 2012). As citocinas, quimiocinas e seus receptores no ambiente inflamatório influenciam direta e indiretamente as propriedades proliferativas e invasivas das células tumorais (AMEDEI; PRISCO; D' ELIOS, 2013; OLIVEIRA et al., 2014), inibindo o desenvolvimento e progressão do tumor ou, paradoxalmente, promovendo crescimento, diminuição da apoptose e facilitando a invasão e metástase (DRANOFF, 2004).

Desta forma, de acordo com o perfil de resposta, diferentes citocinas e quimiocinas são secretadas e receptores são expressos no microambiente

inflamatório e podem favorecer ou dificultar a ação do sistema imunológico contra a infecção. Neste contexto então, ressaltamos o papel das quimiocinas e de seus receptores durante a infecção pelo HPV.

### 1.3.1 Quimiocinas e seus Receptores

As quimiocinas foram estabelecidas como citocinas quimioatraentes em 1992 após o Encontro Internacional de Imunologia em Budapest (LINDLEY; WESTWICK; KUNKEL, 1993). Constituem uma grande família de mediadores inflamatórios e imunológicos, e apresentam similaridade e diferenças com as citocinas. 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 moléculas muito menores que as citocinas e desempenham sua atividade via receptores, com sete  $\alpha$ -hélices transmembrana, acoplados à proteína G, os quais são típicos para atração de leucócitos (BAGGIOLINI, 2001).

As quimiocinas são constituídas de 70 a 130 aminoácidos com quatro resíduos de cisteína conservados (BAGGIOLINI; DEWALD; MOSER, 1994, 1997). Como proteínas secretórias, são sintetizadas com uma sequência guia de 20-25 aminoácidos, a qual é retirada antes de sua liberação. Duas famílias principais, CXC e CC, também conhecidas como  $\alpha$  e  $\beta$  quimiocinas respectivamente, 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 tridimensional, e estas pontes mantêm as regiões aminoterminais juntas, o que é essencial para sua atividade biológica (BAGGIOLINI, 2001).

No entanto, há quimiocinas de outras famílias, como as linfotaxinas, com duas em vez de quatro cisteínas conservadas (KENNEDY et al., 1995), e uma glicoproteína de membrana, fractalcina ou neurotactina, na qual os dois primeiros resíduos de cisteína são separados por três resíduos aminoácidos variáveis (CX3C) (BAZAN et al., 1997; PAN et al., 1997). O domínio aminoterminal é curto (3-10 aminoácidos) enquanto que a hélice carboxiterminal consiste de 20-60 aminoácidos

(CLARK-LEWIS et al., 1995).

Devido à descoberta de muitas moléculas tornou-se necessária a sistematização da nomenclatura para as quimiocinas e para seus receptores. Esta classificação baseia-se no princípio estabelecido para os receptores na Conferência Gordon em 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 (PELUS et al., 2002).

As quimiocinas, além de promoverem a atração de leucócitos aos sítios de inflamação, atuam também no desenvolvimento dos órgãos, na angiogênese, na mobilidade de células tronco, na recirculação dos leucócitos, na regulação e no desenvolvimento imunológico e hematopoiético (BARBIERI et al., 2006; CHENSUE, 2001; LUSTER, 1998; PELUS et al, 2002; PETIT; JIN; RAFII, 2007; SARAFI et al., 1997).

A maioria dos receptores reconhece mais de uma quimiocina e muitas quimiocinas se ligam a mais de um receptor, contudo os receptores CC ligam-se somente as quimiocinas CC, e do mesmo modo os receptores CXC ligam-se somente as 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).

As quimiocinas ganharam destaque científico na década de 90, uma vez que desempenham funções cruciais no desenvolvimento de diferentes doenças e processos patológicos, incluindo a inflamação, doenças autoimunes, doenças infecciosas, e recentemente no câncer (RAMAN et al., 2011).

No presente trabalho destacamos o papel do receptor de quimiocina 5 (CCR5) devido ao seu importante papel durante a inflamação.

### 1.3.2 Receptor de Quimiocina CCR5

O CCR5 (Figura 1) ( $\beta$ -quimiocinas) apresenta sete domínios transmembrana hidrofóbicos e exerce sua atividade via proteína G. Liga-se as quimiocinas CCL5 (RANTES), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) e CCL4 ((MIP-1 $\beta$ ) (SAMSON et al.,

1996) e é codificado pelo locus CMBKR5 localizado no cromossomo 3 (ZIMMERMAN et al.,1997).



Asiáticos (CHANG et al., 2005; O'BRIEN; MOORE, 2000; WANG et al., 2003). Na população brasileira, em uma metanálise conduzida por Silva-Carvalho et al. (2016) uma frequência de 4% foi relatada.

As diferenças na distribuição mundial do alelo CCR5 $\Delta$ 32 podem ser explicadas pela hipótese de que esta mutação surgiu na população Caucásica (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, há 1200 anos ( $fr=0.14$ ; MARTINSON et al., 1997), 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 $\Delta$ 32 poderia estar associada à resistência à infecção pelo HIV (DEAN et al., 1996; LIU et al., 1996; SAMSON et al., 1996; ZUNIGA et al., 2003), e que confere proteção contra asma, artrite reumatóide, esclerose múltipla, e rejeição de enxerto renal em caucásicos (QIDWAY, 2016; ZUNIGA et al., 2003).

Análises *in vitro* de monócitos de portadores CCR5 $\Delta$ 32 demonstraram uma reduzida resposta quimiotática aos ligantes do CCR5 (PANZER et al., 2005). Como a resposta Th1 está associada com a inflamação, o alelo CCR5 $\Delta$ 32 não funcional resulta em uma resposta Th1 menos efetiva, conseqüentemente levando a um estado inflamatório mais brando (CHIES; HUTZ, 2003).

Em relação à infecção pelo HPV e desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais, a perda do controle do ciclo celular, a infiltração leucócitos, bem como a expressão alterada de genes envolvidos na resposta imunológica têm sido considerados eventos críticos na patogênese da infecção pelo HPV, no desenvolvimento de lesões e do câncer cervical (EVANS et al., 1997; GHADERI et al., 2000; O'BRIEN et al., 2001), especialmente as alterações em genes que codificam quimiocinas e seus receptores (GHADERI et al., 2000; OHTA et al., 2002).

Propõe-se desta forma que a deleção no gene CCR5 poderia favorecer a persistência viral, uma vez que a presença do alelo deletado levaria a uma resposta Th1 menos efetiva. Desta forma, neste trabalho investigamos a frequência de alelo CCR5 $\Delta$ 32 na população feminina da região norte do Paraná, portadoras do vírus HPV e também em mulheres não infectadas, uma vez que a variação no gene

*CCR5* pode ser um importante fator dentro dos aspectos imunopatogênicos da infecção pelo vírus HPV bem como no desenvolvimento das lesões intraepiteliais cervicais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a prevalência do vírus HPV em mulheres atendidas em programas de prevenção ao câncer de colo de útero do setor público da região norte do Paraná, e associar sua presença a dados sociodemográficos, reprodutivos e de comportamento sexual, bem como avaliar a influência do polimorfismo rs333 do gene *CCR5* na infecção por HPV, e no desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

#### 2.2.1 Artigo 1

- Avaliar a prevalência do vírus HPV em mulheres atendidas em programas de prevenção ao câncer de colo de útero do setor público da região norte do Paraná.
- Avaliar a prevalência de *Chlamydia trachomatis* em mulheres atendidas em programas de prevenção ao câncer de colo de útero do setor público da região norte do Paraná.
- Avaliar o perfil sócio demográfico das pacientes atendidas em programas de prevenção ao câncer de colo de útero do setor público de saúde da região norte do Paraná;
- Correlacionar as infecções pelo HPV com dados sociodemográficos como faixa etária, etnia, estado civil, grau de escolaridade, conhecimento sobre o vírus, renda familiar das mulheres atendidas e hábito tabagista;
- Verificar a infecção por HPV segundo as variáveis sexuais e reprodutivas como idade da primeira relação sexual, idade da menarca, uso de métodos contraceptivos, número de parceiros sexuais ao longo da vida e nos últimos seis meses, número de partos, assim como a presença de coinfeção por *C. trachomatis*.

#### 2.2.2 Artigo 2

- Analisar a frequência do polimorfismo rs333 de *CCR5* em amostras de pacientes infectadas pelo HPV e controles;
- Comparar a frequência do polimorfismo rs333 de *CCR5* nas pacientes infectadas pelo HPV e controles, por meio de um estudo de associação do tipo caso-controle;
- Avaliar a associação do perfil sócio-demográfico, características reprodutivas e de comportamento sexual em pacientes infectadas pelo HPV e controles de acordo com o polimorfismo rs333 de *CCR5*;
- Associar o polimorfismo rs333 de *CCR5* com o desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais em mulheres infectadas pelo HPV.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, parecer número 133/2012, o qual está de acordo com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa e com a resolução 196/96 – Conselho Nacional da Saúde (CAAE 05505912.0.0000.5231) (Anexo A).

A adesão das pacientes neste projeto de pesquisa ocorreu de forma voluntária, após receberem as informações e explicações sobre o estudo e de seus objetivos. Aquelas que aceitaram participar firmaram a concordância, mediante leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B), e participaram de uma entrevista baseada em um questionário epidemiológico (Apêndice A).

#### 3.2 SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram coletadas 429 amostras por conveniência de pacientes do gênero feminino, com idade superior a 18 anos, atendidas em programas de prevenção ao câncer de colo do útero nos centros de saúde municipal Dr. Justiniano Clímaco da Silva (UBS Vivi Xavier) e Dr. Paulo Roberto Moita da Silva (UBS Armindo Guazzi), no consórcio intermunicipal de saúde do médio Paranapanema (CISMEPAR) e no hospital de clínicas (UEL), localizados em Londrina, Paraná.

O estudo foi realizado no sistema caso-controle, sendo o grupo caso composto por pacientes positivas para o HPV (n=210) e o grupo controle mulheres negativas para o HPV (n=219).

Amostras de secreção cervical contendo células do epitélio cervical uterino foram obtidas no momento do exame ginecológico preventivo de rotina, coletadas, pela enfermeira do serviço, utilizando-se escovas cervicais estéreis, as quais foram acondicionadas em tubos plásticos cônicos de 15 mL contendo 2 mL de solução tampão TE (Tris HCl 10 mM ph 8,0; EDTA 1mM), até serem transportadas sob refrigeração ao laboratório de genética molecular e imunologia da Universidade

Estadual de Londrina, onde foram armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração de DNA.

Amostras de sangue periférico foram obtidas por punção venosa utilizando anticoagulante EDTA e foram transportadas sob refrigeração ao Laboratório de Genética Molecular e Imunologia da Universidade Estadual de Londrina, onde foram armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração de DNA.

### 3.3 EXTRAÇÃO DE DNA

O isolamento de DNA genômico proveniente de secreção cervical uterina foi realizado utilizando-se o reagente DNAzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, EUA), enquanto o DNA genômico de sangue periférico foi isolado pelo Kit de Extração Mini Spin Plus (Biopur, Curitiba, Paraná, BRA), ambos seguindo as recomendações descritas pelo fabricante.

O DNA extraído de cada amostra foi quantificado por espectrofotometria no aparelho NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, EUA), em comprimento de onda de 260 nm (DNA) e 280 nm (proteínas), para cálculos de concentração de DNA ( $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) e verificação de pureza pela razão das absorvâncias ( $A_{260}/A_{280}$ ). Nos experimentos foram utilizadas amostras de DNA que apresentaram razões maiores ou iguais a 1,7.

### 3.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE HPV

#### 3.4.1 Amplificação de Sequências de Nucleotídeos do HPV

A detecção do DNA do HPV foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), devido a sua alta especificidade e sensibilidade. Foram utilizados primers *forward* MY09 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3') e *reverse* MY11 (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'), que flanqueiam uma região de aproximadamente 450 pb, de acordo com o *GenBank Accession number*: AJ236888 (BAUER et al., 1991). Foram utilizados 80 ng de DNA em reação com volume final de 25,0  $\mu\text{L}$ , contendo: Buffer 1X (20 mM Tris-HCL, 50 mM KCL pH 8,5); 2,0 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 0,1875 mM de dNTP; 0,5  $\mu\text{M}$  de cada *primer*; e 1,25 U de Taq DNA polimerase (Life

Technologies, Carlsbad, California, USA), em termociclador (Hangzhou Bio-gender Technology Company, Jianggan, Hangzhou, Zhejiang, CHI), com temperatura de 94°C de desnaturação por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação); 55°C por 60 segundos (hibridização); e 72°C por 60 segundos (extensão), e temperatura de extensão final de 72°C por 8 minutos.

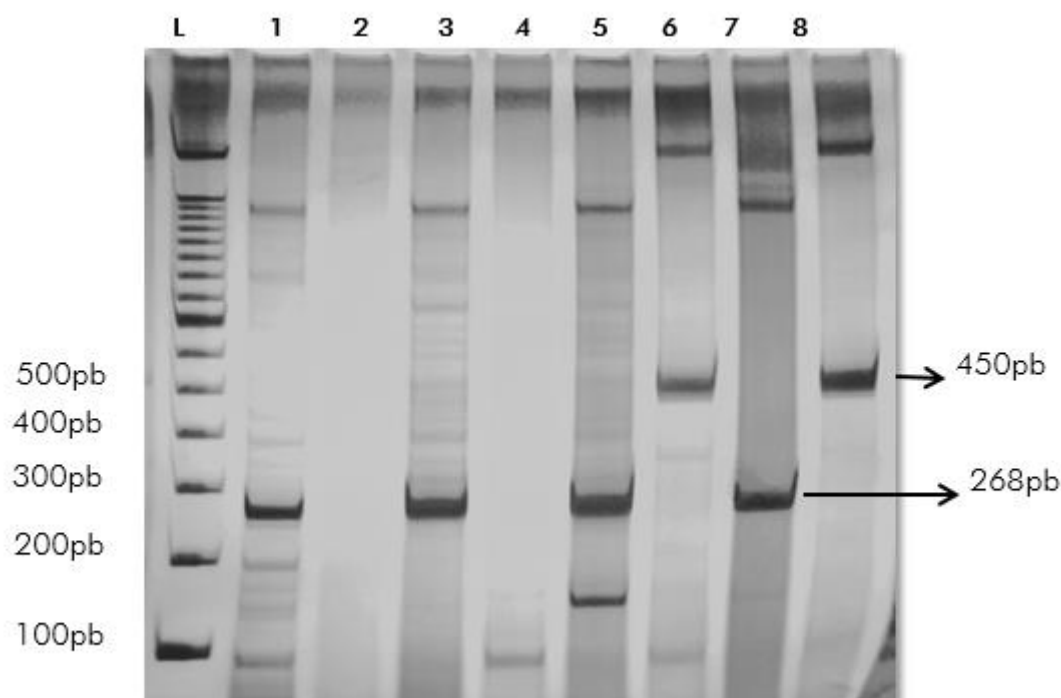
Todas as rea oes foram efetuadas com um controle negativo, sem DNA, a fim de assegurar ausência de contamina o, e com um controle positivo para assegurar a efetividade da rea o, utilizando DNA da linhagem de células HeLa, que contem o material genético do HPV18 inserido em seu genoma.

### 3.4.2 Amplifica o de Sequência de Nucleotídeos do Gene *beta-globina* Humana

Para controle de amplifica o da detec o molecular de HPV foi realizado PCR do gene constitutivo da *beta-globina*. Para isso foram utilizados *primers forward* GH20 (5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') e *reverse* PC04 (5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3'), que flanqueiam uma região de 268 pb (MARANGON et al., 2013). Foram utilizados 80 ng de DNA em rea o com volume final de 25,0 µL, contendo: Buffer 1X; 1,2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM de dNTP; 0,5 µM de cada primer; e 1,25 U de Taq DNA polimerase (Life Technologies, Carlsbad, California, USA), em termociclador (Hangzhou Bio-gender Technology Company, Jianggan, Hangzhou, Zhejiang, China).

Todas as rea oes foram efetuadas com um controle negativo, sem DNA, a fim de assegurar ausência de contamina o. Os fragmentos foram amplificados concomitantemente   PCR de detec o de HPV, com o mesmo ciclo de temperaturas compartilhando o mesmo termociclador (Figura 2).

**Figura 2** - Perfil Eletroforético para detecção do DNA do Vírus HPV



Nota: Gel de poliacrilamida 10% (v/v) corado com nitrato de prata. Onde L representa o Ladder 100pb, Colunas 1, 3, 5 e 7 o fragmento correspondente ao gene da  $\beta$ -globina, 2 e 4 amostras negativas para o HPV, colunas 6 e 8 amostras positivas para HPV.  
Fonte: Kleber de Paiva Trugilo – Dados da Pesquisa.

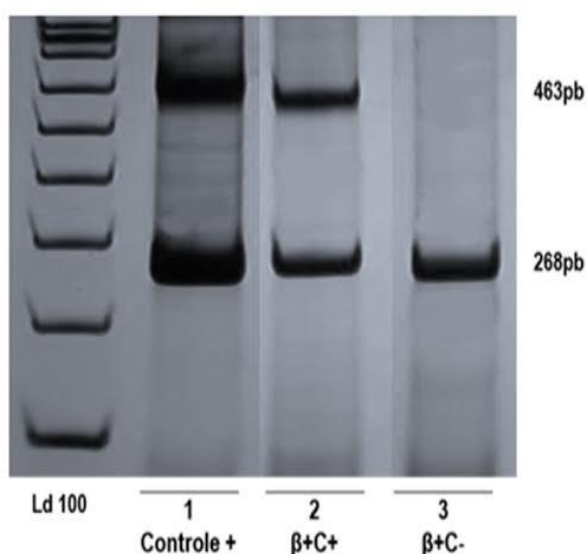
### 3.5 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *C. TRACHOMATIS*

A detecção molecular de *C. trachomatis* foi realizada por PCR Multiplex (sob as condições: buffer concentração 1x; 1,73 mM de  $MgCl_2$ ; 0,33 mM de dNTP; 400 nM de *primer gyrA*; 350 nM de *primer* para  $\beta$ -globina humana e 1 U de Taq DNA polimerase; ciclo inicial a 95°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 62°C, 1 minuto a 72°C e etapa final de extensão a 72°C por 5 minutos) e foram utilizados os iniciadores sense (5'-TGATGCTAGGGACGGATTAAC-3') e antisense (5'-TTCCCCTAAATTATGCGGTGGAA-3'), sendo que estes amplificaram um fragmento contendo 463 pb referentes ao gene *gyrA*, responsável por codificar a subunidade A da DNA girase. Como controle interno de amplificação foi amplificado, sob mesmas condições do PCR para *C. t.*, o gene da  $\beta$ -globina humana por meio dos iniciadores anteriormente descritos. Além disso, foram adicionadas em todas as reações um controle negativo, desprovido de DNA para que houvesse a garantia de não

contaminação; e um controle positivo, o qual consistiu em uma amostra positiva para *C. t.*

Os produtos de PCR da detecção molecular de HPV, de *C. trachomatis* foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% e, posteriormente, corados com nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) (Figura 3).

**Figura 3** - Perfil Eletroforético para detecção do DNA de *Chlamydia trachomatis*



Nota: Gel de poliacrilamida 10% (v/v) corado com nitrato de prata. Onde Ld100 representa o marcador de peso molecular de 100pb, coluna 1 representa controle positivo com amplificação do fragmento correspondente à beta-globina (268pb) e de fragmento correspondente ao gene da Girase A de *Chlamydia trachomatis* (463pb); coluna 2 representa amostra positiva, enquanto a coluna 3 representa uma amostra negativa para a bactéria.

Fonte: Michele Mota Sena - Dados da Pesquisa.

### 3.6 SEQUENCIAMENTO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA HPV E *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

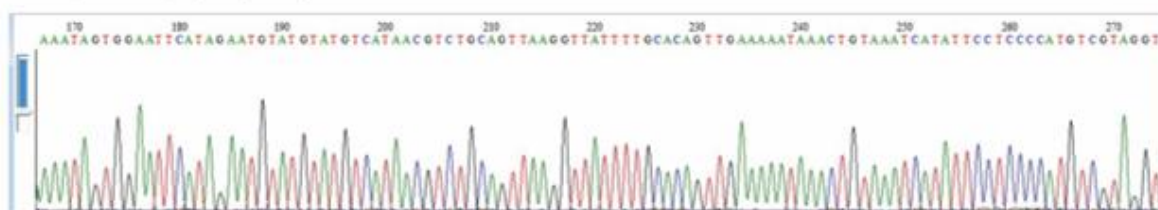
Para confirmação da especificidade dos *primers*, alguns produtos de PCR de amostras positivas para HPV e para *C. trachomatis* foram sequenciados inicialmente purificados utilizando-se o kit comercial PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. A reação de sequenciamento foi realizada com o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando-se 50 ng de DNA, e 5 pM de *primer* (*foward* ou *reverse*) em volume final de 10 uL, sob as seguintes condições:

desnaturação inicial 95°C por 10 s, 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 s, anelamento a 50°C por 20 s, extensão a 60°C por 60 s. Ambas as direções (*forward* e *reverse*) foram sequenciadas utilizando o aparelho ABI 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EUA). A porcentagem de identidade foi determinada pelo BLAST, comparando-se a sequência dos fragmentos com as sequências de nucleotídeos conhecidas de HPV-L1 (HPV) e GyrA (*C. trachomatis*) cadastradas no GenBank.

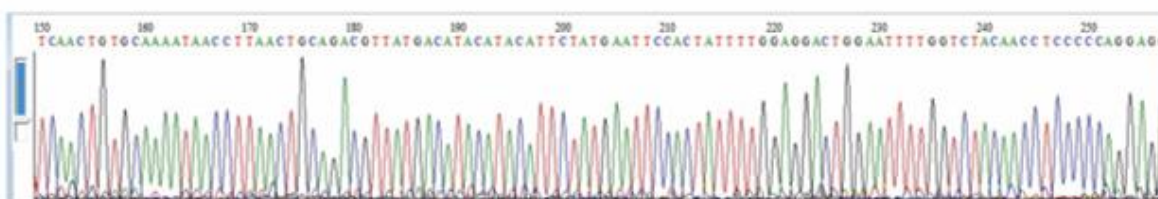
A análise das sequências do HPV demonstrou 100% de identidade com o gene L1, sequência AJ617545.1, para a principal proteína do capsídeo viral (HPV-16) (figura 4). A análise das sequências de *C. trachomatis*, por sua vez, demonstrou 100% de identidade com o gene da subunidade A da DNA girase de *C. trachomatis*, sequência JN795357.1 (figura 5).

**Figura 4** - Sequência de nucleotídeos obtida pelo sequenciamento direto de produto de PCR positivo para HPV

HPV primer F (repetição 1)



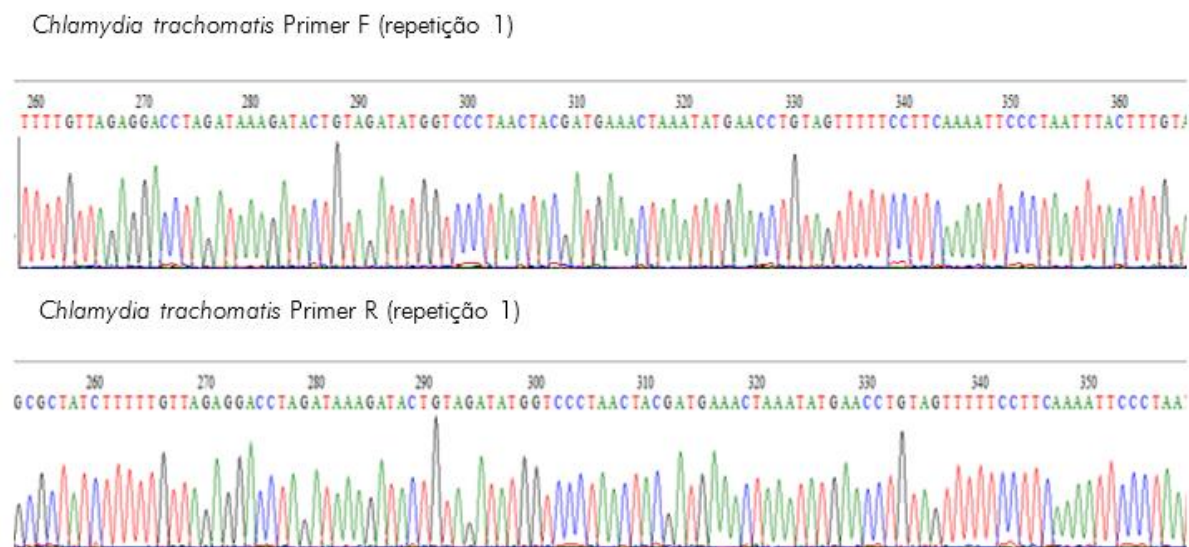
HPV primer R (repetição 1)



Nota: Eletroferograma da sequência obtida a partir do produto de PCR utilizando-se *primers* específicos para HPV (MY09 e MY11). O produto de PCR foi purificado utilizando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA). A especificidade da detecção do HPV foi confirmada pelo sequenciamento no equipamento ABI 3500XL Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA, utilizando-se o kit comercial BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, USA). As sequências resultantes foram analisadas por comparação à sequência AJ617545 cadastrada no *GenBank*, referente ao gene da proteína L1 do capsídeo viral.

Fonte: Autor. Maria Helena P. Fungaro - Dados da Pesquisa.

**Figura 5** - Sequência de nucleotídeos obtida pelo sequenciamento direto de produto de PCR positivo para *C. trachomatis*



Nota: Eletroferograma da sequência obtida a partir do produto de PCR utilizando-se *primers* específicos para *C. trachomatis* (GyrA-1 e GyrA-2). O produto de PCR foi purificado utilizando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA). A especificidade da detecção da *C. trachomatis* foi confirmada pelo sequenciamento no equipamento ABI 3500XL Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA, utilizando-se o kit comercial BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, USA). As sequências resultantes foram analisadas por comparação à sequência JN795357.1 cadastrada no *GenBank*, referente à subunidade A da DNA girase de *Chlamydia trachomatis*.

Fonte: Maria Helena P. Fungaro - Dados da Pesquisa.

### 3.7 ANÁLISE DO POLIMORFISMO RS333 DE *CCR5*

A análise do polimorfismo rs333 de *CCR5* foi realizada pela técnica de PCR. Para tanto foram utilizados iniciadores sintetizados de acordo com a sequência *GenBank* AF009962, *primer sense* (5' ACCAGATCTCAAAAAGAA 3') e *primer anti-sense* (5' CATGATGGTGAAGATAAGCCTCA 3'). Sob as condições: Buffer 1X (20mM Tris-HCl, 50mM KCl pH 8,5); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM de dNTP; 150 nM de primers sense e anti-sense; 1,25 U de Taq DNA polimerase e aproximadamente 75 ng de DNA.

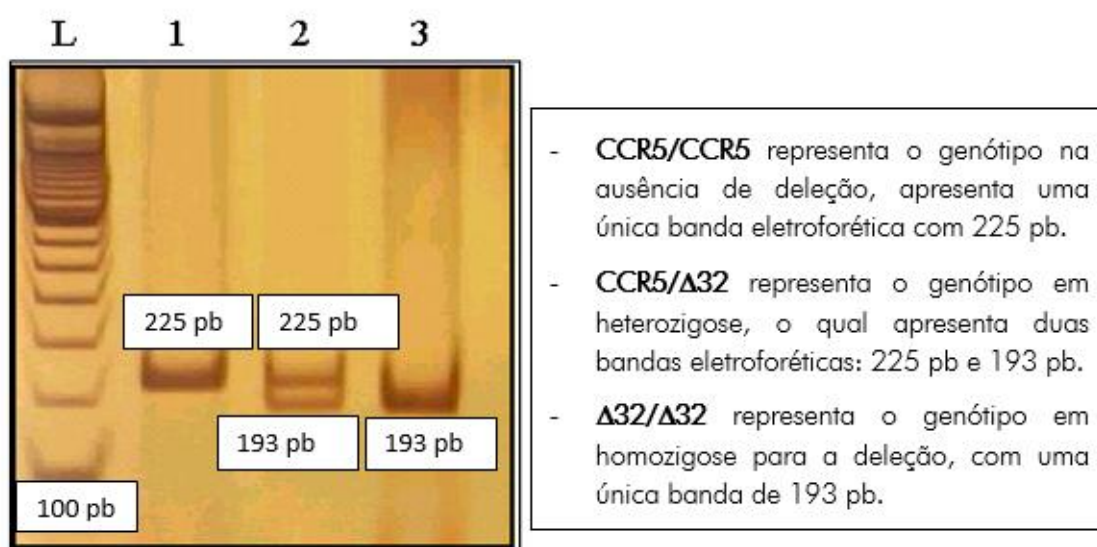
As condições de ciclagem de temperatura consistiram de temperatura inicial de desnaturação, 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de um minuto a 94°C, para desnaturação, um minuto a 58°C, temperatura de anelamento, e um minuto a 72°C para extensão das fitas, com extensão final de 10 minutos a 72°C.

Todas as reações foram efetuadas com um controle negativo (ausência de DNA) a fim de assegurar a ausência de contaminação, e um controle positivo, onde se utilizou DNA de amostra conhecida quantificada anteriormente e

testada em outras ampliações.

Os produtos de PCR para análise do polimorfismo de CCR5 foram submetidos à eletroforese em gel de poliácridamida a 10%, posteriormente corado com nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ). Na Figura 6, o resultado da amplificação pode ser visualizado, onde é possível de se observar os diferentes genótipos observados para o CCR5 na população em estudo.

**Figura 6** – Perfil Eletroforético dos três possíveis genótipos do receptor de quimiocina 5



Nota: Gel de poliácridamida 10% (v/v) corado com prata. Onde L representa o marcador de peso molecular de 100 pb, 1 o genótipo selvagem para o CCR5 (CCR5/CCR5); 2 o genótipo heterozigoto (CCR5/ $\Delta$ 32); e 3 o genótipo homozigoto para o alelo variante ( $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32).

Fonte: Michelle Mota Sena - Dados da Pesquisa.

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Associações entre variáveis categóricas foram analisadas utilizando-se o teste de qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, quando apropriado, e expressos em número absoluto (n) e porcentagem (%). Diferenças entre categorias de uma mesma variável foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney e expressas em mediana e interquartil. A razão de chances foi determinada pela Odds Ratio (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%. Regressão logística binária foi utilizada para delinear os preditores da infecção pelo HPV e do desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais. Em ambas as análises, dados sociodemográficos, de

comportamento sexual e características ginecológicas e obstétricas foram considerados como variáveis explanatórias.

A frequência do alelo deletado ( $\Delta 32$ ) 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. O desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi determinado pelo teste de  $\chi^2$ . A distribuição genotípica entre os grupos estudados foi analisada pelo teste de  $\chi^2$  e pelo cálculo de *Odds Ratio* com intervalo de confiança de 95%. Assim como a análise de regressão logística binária, ajustada para diversos fatores confundidores, foi utilizada para estimar a associação entre os genótipos de *CCR5* e a infecção pelo HPV e o desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais.

Todos os testes foram bicaudados, com nível de significância de  $p \leq 0,05$ . As análises foram realizadas utilizando-se o software SPSS Statistics 22.0 (SPSS inc., Chicago, Illinois, EUA).

## 4 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 ARTIGO 1<sup>1</sup>

#### **CROSS-SECTIONAL ANALYSIS OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION AND CYTOLOGICAL ABNORMALITIES IN GYNECOLOGICAL OUTPATIENTS IN BRAZIL**

**Abstract:** Londrina metropolitan area is the second largest urban agglomerate in the Paraná, Brazil, and the greatest health care demand in the State Northern region. Epidemiological data about HPV occurrence in Paraná are scarce. Therefore, this cross-sectional study aimed to determine the occurrence of HPV infection and cytological abnormalities and investigate potential predisposing factors such as sociodemographic characteristics, sexual behavioral habits and gynecological and obstetric background. Cervical samples were examined for HPV DNA presence by PCR from 429 consenting women. Two groups were formed: non-infected (n = 219, controls) and infected women (n = 210). The HPV infection susceptibility was assessed regarding the potential susceptibility factors data. A greater proportion of women infected by HPV were younger than 25 years of age ( $p < 0.001$ ), single ( $p < 0.001$ ), with monthly income of up to one minimum wage ( $p = 0.018$ ), smokers ( $p = 0.014$ ), who had their first sexual intercourse before the age of 18 years ( $p = 0.012$ ), had at least four sexual partners in their lifetime ( $p < 0.001$ ), and had not been pregnant ( $p = 0.008$ ). The multivariate binary logistic regression analysis showed that age lower than 25 years increased around 5 times the chances of infection (OR = 4.92; CI95% = 1.67 – 14.52;  $p = 0.004$ ), and both married or civil partner (OR = 0.45; CI95% = 0.23 - 0.88;  $p = 0.020$ ) and monthly income of 1 to 3 minimum wage (OR = 0.59; CI95% = 0.36 - 0.95;  $p = 0.030$ ) offered protection against HPV infection. HPV positive group was also analyzed for SIL presence. SIL was more frequent in women who smoked ( $p = 0.017$ ), earned up to one minimum wage monthly ( $p = 0.019$ ), and declared spontaneous abortion ( $p = 0.042$ ). Binary logistic regression analysis showed that monthly income ranging of 1 to 3 minimum wage protected against SIL development in HPV patients (OR = 0.49; CI 95% = 0.26 - 0.93;  $p = 0.028$ ). In conclusion, the results suggest that age, marital status and monthly income are important cofactors for the HPV infection and SIL development in Northern region of Paraná State.

**Keywords:** HPV. Cervical cancer. Risk factors. Squamous intraepithelial lesions.

#### **Introduction**

Cervical cancer (CC) is the fourth most common cancer in women worldwide, and the seventh overall, with an estimated 528,000 new cases in 2012 and more than

---

<sup>1</sup> Será submetido ao periódico Gynecologic and Obstetric Investigation (Fator de impacto = 1,672), e o artigo já está com a normalização solicitada para submissão (Vancouver).

85% of the cases occurring in less developed regions.<sup>[1]</sup> In Brazil, cervical cancer is the third most common cancer among women, with more than 16,000 new cases annually.<sup>[2]</sup> Infection with Human Papillomavirus (HPV) plays a central role in cervical malignancy. It has been clearly demonstrated that high risk HPV infection is necessary to cause progressive cell transformation that leads to squamous intraepithelial lesions (SIL) and cervical cancer.<sup>[3]</sup>

Although many women get cervical HPV infections, studies support the interpretation that most HPV infections are detectable only transiently and do not progress to dysplasia or CC, once HPV persistence is type-specific.<sup>[4,5]</sup>

Some issues regarding the natural history of HPV infection are not understood, but it has been assumed that different cofactors may predispose SIL and CC development and progression. Viral factors as HPV genotype, viral load and coinfection with many HPV types are associated with abnormal cytology in women.<sup>[6]</sup> Furthermore, sexual behavior and environmental or exogenous cofactors, including hormonal contraceptives, tobacco smoking, parity and coinfection with other sexually transmitted agents, markedly *Chlamydia trachomatis* (CT), are linked to the disease process.<sup>[7,8]</sup>

HPV prevalence ranges from 13.7% to 54.3% according to the studied population and geographic area in Brazil.<sup>[9]</sup> Epidemiological data about HPV occurrence in Paraná State are scarce. A large study was performed in the city of Paçandu, Northwest of Paraná, and the overall prevalence of HPV DNA found in this area was lower than the levels found in studies in other Brazilian regions that also used the PCR technique.<sup>[10]</sup> However, it is necessary extend this investigation to the city of Londrina, since it is the second largest urban agglomerate in the state and presents great demand for health care in the Northern region.

The aim of this cross-sectional study was to determine the occurrence of HPV infection and cytological abnormalities and to investigate potential predisposing factors such as sociodemographic characteristics, sexual behavioral habits and gynecological and obstetric background.

## **Materials and Methods**

### *Ethical Approval*

The present study was approved by the Institutional Ethics Committee Involving Humans of the Londrina's State University, Londrina – PR, Brazil (CEP/UEL 133/2012; CAAE 05505912.0.0000.5231). The purpose and procedures of the study were explained to all participants, and written informed consent was obtained prior to sample collection and interview.

### *Study Design and Samples collection*

Women participating in the study are from the city of Londrina and surrounding small localities. This metropolitan city is located in the Northern region of Paraná State, Brazil (country's southern region) and it is more than 300 km away from the respective capital city (Curitiba).

Cervical cells samples were obtained from 429 women who had undergone cytology for cervical cancer prevention in outpatient appointment at colposcopy ambulatory of the Intermunicipal Consortium of Health of the Middle Paranapanema and University Hospital and Clinic Center of State University of Londrina, as well as in two Basic Health-care Units (Municipal Health Centers Dr. Justiniano Clímaco da Silva and Dr. Paulo Roberto Moita da Silva). After sample collection for cytology, the cytobrushes were stored in 2 mL of TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0), at -20°C until analysis. Peripheral blood was drawn in sterile syringes containing EDTA and stored at -20°C until analysis. Patients were interviewed based on a structured questionnaire to collect sociodemographic and sexual behavioral, gynecological and obstetric data.

### *Cervical Cytology*

Cervical smear obtained during preventive consultation in Health-care Units were sent to Public Health System Laboratory. They were evaluated and reported according to Bethesda System (2001) diagnosis criteria. SIL was defined as LSIL, HSIL, atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US) or cannot exclude HSIL (ASC-H), or cervical carcinomas, while normal cytology (NC) excluded all SIL types.<sup>[10]</sup>

### *DNA Extraction*

Cervical cells genomic DNA was obtained from cytobrush samples by DNAzol (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA, USA) while genomic DNA from peripheral blood was extracted by Biopur Mini Spin Plus Kit (Biometrix, Curitiba-PR, Brazil), both methods according to the manufacturer's instructions. DNA concentrations were measured by NanoDrop 2000c™ Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) at 260 nm and purity was assessed through 260 nm/280 nm ratio. After, DNA samples were stored at -20°C.

#### *HPV Detection by Polymerase Chain Reaction (PCR)*

PCR detection of HPV was carried out using MY09 (5'-CGTCCMAARGGAWACTGATC-3') and MY11 (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3') primers which amplify a conserved region of approximately 450 bp of L1 HPV gene.<sup>[11]</sup> Reaction conditions were 190 nM of dNTPs, 500 nM of each primer, 2 mM of MgCl<sub>2</sub>, 1X of Buffer, approximately 80 ng of DNA and 1.25 U of Taq polymerase (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA), with an annealing temperature of 55°C. This method was adopted because it targets very small fragments and consequently is more sensitive than several other molecular techniques. Co-amplification of the human b-globin gene (268 bp) was performed as an internal control by using primers GH20 (5'—GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') and PC04 (5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3') under the same conditions as the HPV PCR. It was also added a negative control (no DNA) in all reactions, in order to ensure no contamination, and a positive control, consisting of HeLa cell lineage DNA, which contains integrated HPV18 genome. The PCR product was analyzed by electrophoresis in 10% polyacrylamide gel, stained with silver nitrate.

#### *PCR Detection of Chlamydia trachomatis (CT)*

PCR assay for detection of CT was performed by using specific primers to gyrA gene: forward primer C2 (5' TGATGCTAGGGACGGATTAACC 3'), and reverse primer C5 (5' TTCCCCTAAATTATGCGGTGGAA 3'), as described previously.<sup>[12]</sup> Co-amplification of the human b-globin gene was also performed as an internal control. For each set of assays, a pool of DNA extracted from cervical cells infected with CT was used as a positive control and "no DNA" as a negative control of amplification. The

amplicons of 463 bp were analyzed by electrophoresis on a 10% polyacrylamide gel stained with silver nitrate.

### *Amplicons Sequencing*

For primers specificity confirmation, some amplicons of both HPV and CT DNA were purified using PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen), following the manufacturer instructions. Sequencing reaction was performed using BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA), 50 ng of DNA template, and 5  $\mu$ M of primer (forward or reverse) in a final volume of 10  $\mu$ L. PCR conditions were as follows: 10 s at 95°C, 30 cycles of 20 s at 95°C, 20 s at 50°C, and 60 s at 60°C. The amplicons were sequenced in a 24-capillary 3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems®). Percent identity was determined through BLAST program, comparing DNA sequence of the amplicons with known HPV L1 or gyrA nucleotide sequences in the GenBank databases.

### *Statistical analysis*

Associations between categorical variables were analyzed using Chi-square ( $\chi^2$ ) test or Fisher's exact probability test, when appropriate, and expressed in absolute number (n) and percentage (%). Differences between categories of the same variable were assessed using the Mann–Whitney test and expressed as median and interquartile range (IQR) 25 % - 75 %. Odds ratio (OR) and 95% confidence interval (95% CI) were determined. Binary logistic regression analysis was used to delineate the significant predictors of HPV infection versus controls (non-infected) and SIL presence versus controls (normal cervical cytology) in HPV infected women. In both analyses, sociodemographic and sexual behavioral, gynecological and obstetric factors were considered as explanatory variables. All tests were two-tailed, and a significance level of  $\alpha=5\%$  was adopted. Analyses were performed using IBM SPSS Statistics 22.0 software (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

## **Results**

Cervical samples of 429 women were examined for HPV DNA presence by PCR, which allowed grouping the women into two groups: HPV negative or non-infected ( $n = 219$ , controls) and HPV positive or infected women ( $n = 210$ ). All participants answered a structure questionnaire about sociodemographic, sexual behavioral, and gynecological and obstetric features.

Some samples were sequenced in order to confirm primers specificity. The percentage of identity was determined through BLAST program, and the obtained sequences for HPV and CT demonstrated 100% of identity with L1 sequence, AJ617545.1, and GyrA CT subunit, JN795357.1, respectively.

Sociodemographic characteristics of HPV negative and positive women are reported in Table 1. Between these groups, there were no significant association in self-reported ethnicity ( $p = 0.189$ ), schooling level ( $p = 0.836$ ), knowledge about both HPV ( $p = 0.509$ ) and virus transmission ( $p = 0.631$ ). However, HPV infected women showed lower median age, 33 (25 – 46) years, than non-infected women, 43 (32 – 52) years ( $p < 0.001$ ). In order to identify in which age range HPV infection is more frequent, the continuous variable “age” was categorized in “age ranges”, as observed in table 1. So, comparing with control group, a greater proportion of women infected by HPV were younger than 25 years of age ( $p < 0.001$ ), single ( $p < 0.001$ ), declared monthly income of up to one minimum wage ( $p = 0.018$ ) and were smokers ( $p = 0.014$ ).

HPV negative and positive groups were also analyzed according to sexual behavioral and gynecological and obstetric characteristics as shown in Table 2. Age at menarche ( $p = 0.213$ ), number of sexual partners within the past 6 months ( $p = 0.051$ ), use of oral contraceptive ( $p = 0.130$ ), use of condom ( $p = 0.445$ ), spontaneous abortion ( $p = 0.276$ ), and CT infection ( $p = 0.056$ ) did not differ statistically between HPV positive group and control. However, HPV infection was associated with the first sexual intercourse before the age of 18 years ( $p = 0.012$ ), at least four sexual partners in their lifetime ( $p < 0.001$ ), and not being pregnant ( $p = 0.008$ ).

The occurrence of CT infection was greater in women positive for HPV infection. Although this difference was not statistically significant, the  $p = 0.056$  may indicate a tendency for higher CT prevalence in HPV infected women.

To verify whether these significant variables (age range, marital status, monthly income, smoking status, age at first sexual intercourse, number of sexual partners during lifetime, and number of pregnancies) were independently associated with HPV

infection, binary logistic regression analysis was performed using control group as reference category. Direct association was found in age lower than 25 years increasing around 5 times the chances of acquiring the virus (OR = 4.92; CI95% = 1.67 - 14.52;  $p = 0.004$ ), and both married or civil partner (OR = 0.45; CI95% = 0.23 - 0.88;  $p = 0.020$ ) and monthly income of 1 to 3 minimum wage (OR = 0.59; CI95% = 0.36 - 0.95;  $p = 0.030$ ) offered protection against HPV infection (Table 3).

After verifying which variables were direct and independently associated with HPV infection, HPV positive group was categorized according to cytological results in normal cytology and SIL presence, in order to analyze the influence of sociodemographic and sexual behavioral, gynecological and obstetric features on SIL development. Among all independent variables analyzed (data not shown), SIL presence was associated with smoking ( $p = 0.017$ ), monthly income up to one minimum wage ( $p = 0.019$ ), and spontaneous abortion ( $p = 0.042$ ). Applying binary logistic regression analysis, setting normal cytology as reference category, only monthly income of 1 to 3 minimum wage was direct and independently associated with SIL, protecting against SIL development in HPV patients (OR = 0.49; CI95% = 0.26 - 0.93;  $p = 0.028$ ) (Table 4).

**Table 1** - Sociodemographic profile of HPV positive and negative women\*

Variable	HPV negative		HPV positive		P
	n	(%)	n	(%)	
<b>Age range (years)</b>					<b>&lt;0.001</b>
< 25	12	(5.6)	46	(22.1)	
25 – 34	53	(24.5)	63	(30.2)	
35 – 44	54	(25.0)	44	(21.2)	
45 – 54	61	(28.2)	28	(13.5)	
> 54	36	(16.7)	27	(13.0)	
<b>Self-Reported Ethnicity</b>					0.189
Caucasian	116	(54.5)	95	(48.0)	
Not Caucasian	97	(45.5)	103	(52.0)	
<b>Schooling level<sup>a</sup></b>					0.836
Until incomplete fundamental education	65	(30.5)	62	(31.4)	
Complete fundamental education	26	(12.2)	24	(12.2)	
Incomplete secondary education	29	(13.6)	29	(14.6)	
Complete secondary education	69	(32.4)	67	(33.8)	
Incomplete higher education	7	(3.3)	7	(3.5)	
Complete higher education	17	(8.0)	9	(4.5)	
<b>Marital status</b>					<b>&lt;0.001</b>
Single	22	(10.1)	52	(24.8)	
Married / Civil partner	158	(72.5)	120	(57.1)	
Divorced	27	(12.4)	24	(11.4)	
Widowed	11	(5.0)	14	(6.7)	
<b>Monthly income<sup>b</sup></b>					<b>0.018</b>
≤ 1 minimum wage	56	(26.3)	75	(39.2)	
1 – 3 minimum wages	140	(65.7)	101	(52.9)	
> 3 minimum wages	17	(8.0)	15	(7.9)	
<b>Smoking status</b>					<b>0.014</b>
No	181	(83.8)	151	(74.0)	
Yes	35	(16.2)	53	(26.0)	
<b>Knowledge about HPV</b>					0.509
No	42	(19.5)	48	(24.1)	
Have ever heard	117	(54.5)	100	(50.3)	
Yes	56	(26.0)	51	(25.6)	
<b>Knowledge about transmission</b>					0.631
No	97	(45.1)	94	(47.5)	
Yes	118	(54.9)	104	(52.5)	

Analysis by two-sided Chi-square ( $\chi^2$ ) test and  $p < 0.05$  set as significance level; data expressed as absolute number and percentage (%). <sup>a</sup>Based on Brazilian educational system. <sup>b</sup>Based on Brazilian minimum wage (approximately U\$ 250.00).

\* For sociodemographic characteristics analysis between HPV non-infected and infected patients not all 429 women were included, with variations depending on the characteristic analyzed.

**Table 2** - Sexual behavioral and gynecological and obstetric characteristics profile of HPV positive and negative women\*

Variable	HPV negative		HPV positive		P
	n	(%)	n	(%)	
<b>Age at menarche (years)</b>					0.213
≤ 12	98	(45.2)	106	(51.2)	
> 12	119	(54.8)	101	(48.8)	
<b>Age at first sexual intercourse (years)</b>					<b>0.012</b>
< 18	108	(49.5)	127	(61.7)	
≥ 18	110	(50.5)	79	(38.3)	
<b>Sexual partners during the lifetime</b>					<b>&lt;0.001</b>
1	87	(40.5)	45	(22.8)	
2 – 3	70	(32.5)	68	(34.6)	
≥ 4	58	(27.0)	84	(42.6)	
<b>Sexual partners within the past 6 months</b>					0.051
≤ 1	207	(99.0)	178	(95.7)	
> 1	2	(1.0)	8	(4.3)	
<b>Oral contraceptive</b>					0.130
No	148	(69.2)	128	(62.1)	
Yes	66	(30.8)	78	(37.9)	
<b>Condom</b>					0.445
No	191	(88.8)	171	(86.4)	
Yes	24	(11.2)	27	(13.6)	
<b>Number of pregnancies</b>					<b>0.008</b>
0	19	(8.7)	37	(17.6)	
1	36	(16.4)	45	(21.4)	
2	72	(32.9)	47	(22.4)	
3	46	(21.0)	47	(22.4)	
≥ 4	46	(21.0)	34	(16.2)	
<b>Spontaneous Abortion</b>					0.276
No	175	(79.9)	172	(81.9)	
Yes	44	(20.1)	38	(18.1)	
<b><i>C. trachomatis</i> infection</b>					0.056
No	92	(94.8)	110	(87.3)	
Yes	5	(5.2)	16	(12.7)	

Analysis by two-sided Chi-square ( $\chi^2$ ) test or by Fisher's exact test when appropriated and  $p < 0.05$  set as significance level; data expressed as absolute number and percentage (%).

\* For sexual behavioral and gynecological and obstetric characteristics analysis between HPV non-infected and infected patients not all 429 patients were included, with variations depending on the characteristic analyzed.

**Table 3** - Binary logistic regression between women groups non-infected (reference) and infected by HPV as dependent variable and explanatory variables.

<b>Variable</b>	$\chi^2_{\text{Wald}}$	<b>df</b>	<b>OR</b>	<b>CI<sub>95%</sub></b>	<b>P</b>
<b>Age range (years)</b>					
< 25	8.32	1	4.92	(1.67 – 14.52)	<b>0.004</b>
25 – 34	3.22	1	2.10	(0.93 – 4.70)	0.073
35 – 44	8.34	1	1.26	(0.59 – 2.67)	0.549
45 – 54	15.26	1	0.69	(0.33 – 1.48)	0.346
> 54	-	4	1.00	Reference	-
<b>Marital status</b>					
Single	-	3	1.00	Reference	-
Married / civil partner	5.42	1	0.45	(0.23 - 0.88)	<b>0.020</b>
Divorced	0.65	1	0.70	(0.29 - 1.67)	0.419
Widowed	0.01	1	1.07	(0.36 - 3.21)	0.904
<b>Monthly income<sup>a</sup></b>					
≤ 1 minimum wage	-	2	1.00	Reference	-
> 1 – 3 minimum wages	4.70	1	0.59	(0.36 - 0.95)	<b>0.030</b>
> 3 minimum wages	0.06	1	1.11	(0.47 - 2.67)	0.808
<b>Smoking status</b>					
No	-	2	1.00	Reference	-
Yes	0.91	1	1.31	(0.75 - 2.28)	0.341
<b>Number of pregnancies</b>					
0	-	4	1.00	Reference	-
1	0.04	1	1.09	(0.48 - 2.49)	0.844
2	0.22	1	0.82	(0.36 - 1.87)	0.640
3	0.86	1	1.52	(0.63 - 3.69)	0.354
≥ 4	0.01	1	1.06	(0.41 - 2.71)	0.909
<b>Age at first sexual intercourse (years)</b>					
≥ 18	-	2	1.00	Reference	-
< 18	0.001	1	0.99	(0.62 - 1.63)	0.980

OR, odds ratio; CI<sub>95%</sub>, 95% confidence interval.

<sup>a</sup>Based on Brazilian minimum wage, approximately U\$ 250.00.

**Table 4** - Binary logistic regression between HPV infected women with normal cytology (reference) and with SIL and explanatory variables.

Variable	$\chi^2_{Wald}$	df	OR	CI <sub>95%</sub>	P
<b>Monthly income<sup>a</sup></b>					
≤ 1 minimum wage	-	2	1.00	Reference	-
> 1 – 3 minimum wages	4.84	1	0.49	(0.26 - 0.93)	<b>0.028</b>
> 3 minimum wages	3.08	1	0.318	(0.09 - 1.14)	0.080
<b>Smoking status</b>					
No	-	2	1.00	Reference	-
Yes	0.91	1	1.73	(0.84 - 3.56)	0.136
<b>Spontaneous Abortion</b>					
No	-	-	1.00	Reference	-
Yes	0.001	1	2.19	(0.96 – 4.98)	0.063

OR, odds ratio; CI<sub>95%</sub>, 95% confidence interval. <sup>a</sup>Based on Brazilian minimum wage, approximately US\$ 250.00.

## Discussion

In this cross-sectional study, it was determined the occurrence of HPV infection by PCR and predisposing factors for infection and cytological abnormalities in women assisted in the Public Health System (SUS) in Londrina, state of Paraná, Brazil. To the best of our knowledge, this is the first epidemiologic and molecular report that evaluated the HPV occurrence in this metropolitan region of the state.

This study revealed a rate of HPV infection of 49.0% of analyzed women. In this region, HPV infection was associated with four sociodemographic factors (age, marital status, smoking status and monthly income), two sexual behavioral variables (age at first sexual intercourse and sexual partners during the lifetime) and one gynecologic and obstetric aspect (parity). Only age with lower than 25 years, marital status with married or civil partner and monthly income with 1 to 3 minimum wages (the last two variables offering protection against virus) were independently associated with HPV infection by multivariate model.

Association between young age and HPV infection is well established in medical literature as an independent factor, which demonstrates that HPV prevalence is age-specific for both low- and high-risk types all over the world.<sup>[13]</sup> Teenagers and young women are more sexually active and more vulnerable to pathogen infections due to the relative immaturity of the genital tract and presence of cervical ectopy, making it prone to both trauma and infection, particularly in the developing transformation zone of the cervix.<sup>[14]</sup>

Single women were significantly more frequent in HPV group. Accordingly, Foliaki et al.<sup>[15]</sup> have shown that unmarried women are more likely to be infected by HPV, since they present a higher risk behavior. It was also observed a significant independent higher proportion of married women in the control group than in HPV infected group, it is plausible to assume that it happens because they have a stable partner.

Women who declared monthly income equal or less than 1 minimum wage were more prone to be infected by HPV. Interestingly, monthly income from 1 to 3 minimum wages was independently associated with HPV infection protection. These findings make sense if we consider that less than one minimum Brazilian monthly wage (that means low socioeconomic status) is strongly associated to HPV infection in studies in Brazilian Northeastern region and abroad.<sup>[16,17]</sup> Indeed, sociodemographic evidence shows the social inequalities associated to high risk HPV infection leading to cervical cancer, since the virus presence is more frequent in public health services than in private clinics.<sup>[18]</sup>

Tobacco smoking was also related with HPV infection in this study. Several compounds from cigarette smoke, as nicotine (and its major metabolite, cotinine) and carcinogenic tobacco-specific N-nitrosamines have been identified in cervical mucus, highlighting the synergistic action between cigarette smoking and HPV infection.<sup>[19]</sup> Another tobacco carcinogen, benzo[a]pyrene (BaP), may interact with HPV, modulating the virus life cycle and enhancing its synthesis.<sup>[20]</sup> Tobacco smoking may also decrease the density of Langerhans cells and T lymphocytes in transformation zone, impairing the local immunosurveillance in the uterine cervix.<sup>[21]</sup>

Regarding sexual behavioral and gynecologic and obstetric aspects, association was observed between HPV infection and first sexual intercourse before the age of 18 years and at least four sexual partners during lifetime. As mentioned before, physiological ectopy and immature genital tract may explain the HPV infection predisposition in young women. In addition, high number of sexual partners is an important risk factor for HPV acquisition.<sup>[16]</sup> Although we observed a significant association between HPV infection and no pregnancy, this finding may be biased by the young age of patients. High parity is consistently related to HPV infection susceptibility, and nutritional, hormonal, traumatic and immunologic mechanisms are thought to be important in this relation.<sup>[22]</sup>

Our study showed a tendency for association between HPV infection and intracellular bacteria *Chlamydia trachomatis* (CT). This tendency was also reported by Nonato et al.<sup>[23]</sup> Limitations related to the low number of women presenting HPV/CT coinfection may have contributed towards these results in both studies. In this concern, the relation between CT genital infections and HPV has been investigated most thoroughly in CC development. CT infection facilitates infection and re-infection by multiple HPV types, enable viral persistence and increases CC development risk in coinfection cases.<sup>[8,24,25,26]</sup> In fact, there are evidences highlighting that CT and HPV share the same transmission route and the same risk factors.<sup>[25]</sup>

Concerning the variables that were associated with cytological abnormalities, smoking women were more prevalent in SIL group. Tobacco smoking does not only affect HPV biology, but also the process of carcinogenesis. Malignant transformation of HPV16-immortalized human endocervical cells by cigarette smoke condensate has been proven.<sup>[27]</sup> Wei et al.<sup>[28]</sup> demonstrated that tobacco smoking acts promoting HR-HPV oncogene expression in cells that maintain episomal viral genomes, suggesting a more prominent role for tobacco smoke in earlier stages of HPV-related cancer progression.

Spontaneous abortion occurrence was also related with SIL presence. However, this factor did not show to be an independent risk factor after adjustment for the other variables, as shown by Deacon et al.<sup>[29]</sup> and Hildesheim et al.<sup>[30]</sup>

We found an independent association with monthly income of 1 to 3 minimum wages and protection to SIL in women infected by HPV. Such finding suggests the higher the monthly income of women, the less susceptible they are to the development of HPV caused cervical lesions. This thought reinforces the general observation that due to the limited access to both economic and educational resources as well as to prevention information and tools, poor women and girls in many parts of the world are more vulnerable to sexually transmitted diseases.<sup>[31]</sup>

Cervical cancer screening has been effectively performed in Brazil through the *Pap* smear test, method that has decreased the incidence of CC in the country in the last five decades. Nevertheless, each year, new cases of CC have been detected and mortality from this type of cancer is still alarming around the world.<sup>[32]</sup> It is not difficult to rationalize that this screening failure is due to subjective and poorly reproducible

nature of cervical cytology. *Pap* test possesses limited sensitivity, requiring regular repetitions to achieve the desired efficacy and may suffer inter-observer variability.<sup>[10]</sup>

Our effort is to draw attention to robust evidence by our cohort and several reports published in the last years that diagnosis performed by HPV DNA testing using polymerase chain reaction combined with cytological analysis make HPV and lesions detection more accurate, even when abnormalities are not seen in *Pap* smear. Although HPV DNA testing is not part of the routine in the Public Health System (SUS) in Brazil, this test is recommended internationally and its introduction could enable the effective CC screening and control.<sup>[33]</sup>

In summary, we described in our population-based study the HPV occurrence in Northern region of Paraná State and important cofactors for the HPV infection and SIL development. In this sense, we hope to contribute to a better characterization of the HPV epidemiology and to the implementation of public health policies in Brazil.

### **Conflict of Interests**

The authors declare that there are no conflicts of interests.

### **Acknowledgments**

The authors would like to acknowledge the volunteers who made this study possible. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Londrina State University Coordination for Post-Graduation (PROPPG-UEL). The authors wish to express their gratitude to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação Araucária do Paraná for financial support.

### **References**

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 2012 Mar; 136(5):E359-E356.
2. Instituto Nacional do Câncer (BR). Estimate 2016: cancer incidence in Brazil, Rio de Janeiro: INCA; 2016.

3. Muñoz N, Bosch FX, De Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003 Feb;348(6):518-27.
4. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003 Jul; 89(1):101-5.
5. Schiffman MH. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. 1992 Mar;84(6):394-8.
6. Flores R, Papenfuss M, Klimecki WT, Giuliano AR. Cross-sectional analysis of oncogenic HPV viral load and cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*. 2006 Mar; 118(5):1187-93.
7. Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006 Aug; 24(Suppl3):1-10.
8. Samoff E, Koumans EH, Markowitz LE, Sternberg M, Sawyer MK, Swan D et al. Association of *Chlamydia trachomatis* with persistence of high-risk types of human papillomavirus in a cohort of female adolescents. *Am. J Epidemiol*. 2005 Oct; 62(7):668-75.
9. Ayres ARG, Silva GA. Cervical HPV infection in Brazil: systematic review. *Rev Saude Publica*. 2010;44 (5):963-74.
10. Da Silva MC, Martins HP, de Souza JL, Tognim MC, Svidzinski TI, Teixeira JJ, et al. Prevalence of HPV infection and genotypes in women with normal cervical cytology in the state of Paraná, Brazil. *Arch. Gynecol Obstet*. 2012 Oct; 286(4):1015-22.
11. Bauer HM, Ting Y, Greer CE, Chambers JC, Tashiro CJ, Chimera J, et al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA*. 1991 Jan;265(4):472-7.
12. Patel AL, Sachdev D, Nagpal P, Chaudhry U, Sonkar SC, Mendiratta SL. Prevalence of *Chlamydia* infection among women visiting a gynaecology outpatient department: evaluation of an in-house PCR assay for detection of *Chlamydia trachomatis*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2010;9:24.
13. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine*. 2008 Aug; 26(Suppl 10): K1-16.
14. Lee V, Tobin JM, Foley E. Relationship of cervical ectopy to chlamydia infection in young women. *J Fam Plann Reprod Health Care*. 2006 Apr;32(2):104-6.

15. Foliaki S, Brewer N, Pearce N, Snijders PJ, Meijer CJ, Waqatakirewa L, et al. Prevalence of HPV infection and other risk factors in a Fijian population. *Infect Agent Cancer*. 2014 Apr;9(1):14.
16. Kahn JA, Lan D, Khan RS. Sociodemographic factors associated with high-risk human papillomavirus infection. *Obstet Gynecol*. 2007 Jul;110(1):87-95.
17. Mendonça VG, Guimarães MJB, Lima Filho JL, Mendonça CG, Martins DBG, Crovella S, et al. Human papillomavirus cervical infection: viral genotyping and risk factors for high-grade squamous intraepithelial lesion and cervix cancer. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2010 Oct; 32(10):476-85.
18. Oliveira LHS, Rosa MLG, Pereira CRN, Vasconcelos GALBM, Silva RA, Barrese TZ, et al. Human papillomavirus status and cervical abnormalities in women from public and private health care in Rio de Janeiro State, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2006 Sept-Oct;48(5):279-85.
19. Prokopczyk B, Cox JE, Hoffmann D, Waggoner SE. Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J Nat Cancer Inst*. 1997 Jun;89(12):868-73.
20. Alam S, Conway MJ, Chen HS, Meyers C. The cigarette smoke carcinogen benzo[a]pyrene enhances human papillomavirus synthesis. *J Virol*. 2008 Jan;82(2):1053-1058.
21. Poppe WAJ, Ide PS, Drijkoningen MP, Lauweryns JM, Van Assche FA. Tobacco Smoking Impairs the Local Immunosurveillance in the Uterine Cervix. *Gynecol Obstet Invest*. 1995;39(1):34-38.
22. Castellsagué X, Muñoz N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Nat Cancer Inst Monog*. 2003;(31):20-28.
23. Nonato DR, Alves RR, Ribeiro AA, Saddi VA, Segati KD, Almeida KP, et al. Prevalence and factors associated with coinfection of human papillomavirus and *Chlamydia trachomatis* in adolescents and young women. *Am J Obstet Gynecol*. 2016 Dec;205(6):753.
24. Barros NKS, Costa MC, Alves RR, Villa LL, Derchain SF, Zeferino LC, et al. Association of HPV Infection and *Chlamydia trachomatis* Seropositivity in Cases of Cervical Neoplasia in Midwest Brazil. *J Med Virol*. 2012 Jul;84(7):1143-150.
25. Seraceni S, De Seta F, Colli C, Del Savio R, Pesel G, Zanin V, et al. High prevalence of hpv multiple genotypes in women with persistent chlamydia trachomatis infection. *Infect Agent Cancer*. 2014 Sept; 9(1):1-7.
26. Shew ML, Ermel AC, Weaver BA, Tong Y, Tu W, Kester LM, et al. Association of *Chlamydia trachomatis* Infection With Redetection of Human Papillomavirus After Apparent Clearance. *J Infect Dis*. 2013 Nov; 208(9):1416-21.

27. Yang X, Jin G, Nakao Y, Rahimtula M, Pater MM, Pater A. Malignant transformation of HPV 16-immortalized human endocervical cells by cigarette smoke condensate and characterization of multistage carcinogenesis. *Int J Cancer*. 1996 Jan;65(3):338-44.
28. Wei L, Griego AM, Chu M, Ozbun MA. Tobacco exposure results in increased E6 and E7 oncogene expression, DNA damage and mutation rates in cells maintaining episomal human papillomavirus 16 genomes. *Carcinogenesis*. 2014 Oct;35(10):2373-81.
29. Deacon JM, Evans CD, Yule R, Desai M, Binns W, Taylor C, et al. Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: a case-control study nested within the Manchester cohort. *Br J Cancer*. 2000 Dec;83(11):1565-72.
30. Hildesheim A, Herrero R, Castle PE, Wacholder S, Bratti MC, Sherman ME, et al. HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. *Br J Cancer*. 2001 May;84(9):1219-26.
31. Krishnan S, Dunbar MS, Minnis AM, Medlin CA, Gerdtts CE, Padiana NS. Poverty, gender inequities, and women's risk of human immunodeficiency virus'. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Oct; 1136 (1): 101-10.
32. Crothers JW, Mount SL, Harmon M, Wegner E. The utility of human papillomavirus testing in young women with atypical glandular cells on pap test. *J Low Genit Tract Dis*. 2015 Jan;19(1):22-6.
33. Jin XW, Lipold L, McKenzie M, Sikon A. Cervical cancer screening: What's new and what's coming? *Cleve Clinic J Med*. 2013 Mar; 80(3):153-60.

4.2 ARTIGO 2<sup>2</sup>**Analysis of CCR5 genetic variant and HPV infection in Brazilian population****ABSTRACT**

Human Papillomavirus (HPV) infection can lead to the development of productive epithelial lesions and cervical cancer. Most cervical HPV infections are solved by cell-mediated immunity within 1–2 years and it is known that chronic inflammation predisposes to lesions progression and tumor development. In this context we highlight the CC chemokine receptor 5 (CCR5) which is involved in leucocytes chemotaxis to sites of inflammation, controlling the immune response. Therefore the aim of the present study was to investigate the association of (chemokine receptors) CCR5 rs333 polymorphism with HPV infection and squamous intraepithelial lesions development. The CCR5 rs333 genotyping of 164 HPV infected women and 185 non infected women was performed using polymerase chain reaction. HPV infection was more frequent among women under 34 years old ( $p < 0.001$ ), single ( $p = 0.001$ ), that received 1 minimum wage or less ( $p = 0.002$ ), tobacco smokers ( $p = 0.007$ ), who had the first sexual intercourse before 17 years old ( $p = 0.038$ ) and that had 4 or more sexual partners during lifetime ( $p = 0.001$ ). No significant difference regarding genotypes and alleles distribution according to HPV infection was observed. CCR5/CCR5 genotype was observed in 94.1% of HPV non infected women and in 89% of infected ones, CCR5/ $\Delta$ 32 in 5.9% of HPV infected and in 10.4% of non infected women, and  $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32 was observed in only one (0.6%) infected patient. CCR5 genotypes were also not associated with cervical lesions development among HPV infected women ( $p = 0.167$ ). Since CCR5 may control the antitumor immune response and cervical lesions and the studied rs333 polymorphism is not very frequent, other studies are necessary, in order to establish CCR5 role on HPV infection and squamous intraepithelial lesions development.

**Keywords:** Cervical Cancer; Cervical Intraepithelial Lesions; CCR5.

---

<sup>2</sup> Será submetido ao periódico International Journal of Immunogenetics (Fator de impacto = 1,174), e o artigo já está com a normalização solicitada para submissão (APA).

## 1. INTRODUCTION

Human papilloma viruses (HPV) are small non enveloped virus containing double stranded DNA as their genetic material and are considered an important infectious agent sexually transmitted, infecting sexually active men and women, turning into a serious health concern, due to its involvement in cervical carcinogenesis (Faridi et al., 2011).

HPV is a necessary cause of cervical cancer in women worldwide. Although HPV exerts a vital influence on cervical carcinogenesis, other factors influence the development of a squamous intraepithelial lesion (SIL) that may or not progress to cervical cancer. In the cervical microenvironment, several immune components play important roles in establishing HPV infection as well as on SIL regression or progression to cervical cancer (Berti et al., 2017).

In this context immune mediators, such as chemokines and their receptors (small chemotactic cytokines that direct the migration of leukocytes during inflammation) are important since they are involved in the regulation of leukocyte trafficking in many essential biological processes, including inflammation, which is thought to facilitate carcinogenesis by providing a microenvironment that is ideal for tumor cell development and growth (Rossi & Zlotnik, 2000; Okuyama et al., 2016).

Genetic variations in genes encoding chemokines receptors can lead to chronic inflammation-related dysregulation (Guernon & Combadière, 2012). Among these we highlight the *CCR5* rs333 polymorphism, first described by Liu et al. (1996). *CCR5* $\Delta$ 32 variant, with 32 base pairs deletion in the *CCR5* gene, produces an mRNA frame shift and the emergence of a stop codon, resulting a truncated inactive receptor that is not expressed on the cell membrane (Dean et al., 1996; Huang et al., 1996).

Since the *CCR5* chemokine receptor is involved in leucocytes chemotaxis to sites of inflammation playing an important role in the macrophages, T cells, and monocytes recruitment it may have an indirect effect on cancer progression by controlling the immune response (Oliveira et al., 2014).

Therefore, the aim of the present study was to analyze the distribution of *CCR5* $\Delta$ 32 polymorphism among HPV infected and non infected women and possible contribution to cervical lesions development from North region of Paraná, Brazil.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### *2.1. Ethical approval*

This study was approved by the Institutional Ethics Committee Involving Humans at State University of Londrina, Londrina – PR, Brazil (CEP/UEL 133/2012; CAAE 05505912.0.0000.5231). The study purpose and the procedures involved were explained to all participants, and written informed consent was obtained prior to sample collection and interview.

### *2.2 Study Design and Samples collection*

In this case-control study, we analyzed 349 women who underwent outpatient cytology testing between 2013 and 2016 at an ambulatory colposcopy facility of the Intermunicipal Consortium of Health of the Middle Paranapanema, at University Hospital and Clinic Center of State University of Londrina, and at two Basic Healthcare Units in Londrina – PR, Brazil. After sample collection, cytobrushes were stored in 2 mL TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) at -20°C until analysis. Peripheral blood was drawn by sterile syringues, in tubes containing EDTA as anticoagulant, and stored at -20°C until analysis. Patients were interviewed using a structured questionnaire to collect socio-demographic, reproductive and sexual behavioral data. Participants were stratified based on presence or absence of HPV DNA, as tested by PCR, and based on lesion grade, as determined by cervical cytology.

### *2.3 DNA extraction*

Genomic DNA was obtained from cervical cytobrushes using DNAzol (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions, and stored at -20°C. Genomic DNA from peripheral blood samples was extracted using the Biopur Mini Spin Plus Kit (Biometrix, Curitiba, PR, Brazil). DNA concentration was measured by Thermo Fisher Scientific NanoDrop 2000c® Spectrophotometer (USA) at 260 nm and purity was assessed through 260/280 ratio.

#### 2.4 HPV detection by PCR

HPV PCR was carried out using MY09 and MY11 primers, according to GenBank Accession number: AJ236888. These primers amplify a conserved region of approximately 450 base pairs (bp) of L1 HPV gene (Bauer et al., 1991). Reaction conditions were 190 nM of dNTPs, 500 nM of each primer, 2 mM of MgCl<sub>2</sub>, 1X of Buffer, approximately 80 ng of DNA and 1,25U of Taq polymerase (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA), with an annealing temperature of 55°C. Co-amplification of the human  $\beta$ -globin gene (268 bp) was performed as an internal control, using primers GH20 (5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') and PC04 (5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3') under the same conditions as the HPV PCR. A negative control sample (no DNA) was performed during all reaction sets in order to exclude possible contamination. Also, a positive control consisting of HeLa cell lineage DNA, which contains HPV18 genome integrated to cell genome, was adopted.

#### 2.5 CCR5 rs333 polymorphism analysis

CCR5 rs333 polymorphism was assessed by standard PCR fragment length analysis as previously described by our group (Oliveira et al., 2007). All DNA amplification reactions were performed with appropriate negative controls. PCR products of 225 and 193 bp were analyzed by electrophoresis in 10% silver stained polyacrilamide gel.

#### 2.6 Statistical analysis

Categorical data were analyzed by  $\chi^2$  test and results expressed as absolute value and percentage. Continuous data were analyzed by parametric tests when normality was assumed (t Test). Binary logistic regression analysis, with adjustment for several confounders was used to estimate the association between polymorphism genotypes and HPV infection status. All tests were two-tailed, with a  $p$  value <0.05 considered for statistical significance. The odds ratio (OR) was estimated for all analyses, adopting a 95% confidence interval (CI). All statistical analyses were carried out using the SPSS Statistics 22.0 software (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

### 3. RESULTS

In the present study, 349 women were assessed and after HPV molecular diagnosis categorized as HPV infected patients (164 / 47.0%) and HPV non-infected patients (185 / 53.0%). HPV infected patients mean age was  $35.7 \pm 13.1$  years (median 33), while HPV non-infected women mean age was  $42.4 \pm 11.8$  years (median 42), with HPV infected women being significantly younger ( $p < 0.001$ ).

Socio-demographic data is presented in Table 1 and reproductive and sexual behavioral features are presented in Table 2 and 3. A higher frequency of HPV infection was observed among women under 34 years old ( $p < 0.001$ ), single ( $p = 0.001$ ), that received 1 minimum wage or less ( $p = 0.002$ ), tobacco smokers ( $p = 0.007$ ), who had the first sexual intercourse before 17 years old ( $p = 0.038$ ) and that had 4 or more sexual partners during lifetime ( $p = 0.001$ ).

Notably, among HPV infected women, 79 (50.3%) did not present cervical lesions, 24 (15.3%) had low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) and 54 (34.4%) high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL). When compared to no cervical lesions group as reference, high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) were more frequent in women receiving 1 minimum wage or less ( $p = 0.002$ ) (Table 4).

*CCR5* rs333 polymorphism genotypes distribution among HPV non-infected and infected patients were in Hardy-Weinberg equilibrium ( $p \geq 0.05$ ). Among HPV non-infected patients 94.1% (174) presented *CCR5/CCR5* genotype, 5.9% (11) *CCR5/Δ32* and the genotype  $\Delta 32/\Delta 32$  was not observed among non-infected women. Assessing HPV infected women *CCR5/CCR5* genotype was observed in 89.0% (146) of them, 10.4% (17) presented *CCR5/Δ32* and 0.6% (01)  $\Delta 32/\Delta 32$  genotype. Therefore no significant difference regarding genotypes and alleles distribution according to HPV infection was observed, however it was observed a tendency for  $\Delta 32$  allele (OR = 2.007, CI95% 0.941-4.282,  $p = 0.072$ ) (Table 5).

We also analyzed if *CCR5* rs333 genotypes were associated to cervical lesions development among HPV infected women, but no significant difference was observed ( $p = 0.167$ ) (Table 6).

#### 4. DISCUSSION

In the present study we examined the possible association between *CCR5* rs333 polymorphism and HPV infection and cervical lesions development. Regarding sociodemographic, reproductive and sexual characteristics we observed that HPV infected women were significantly younger than non-infected ones, with a higher frequency of HPV infection observed among women under 34 years old, single, that received 1 minimum wage or less, tobacco smokers, who had the first sexual intercourse before 17 years old and that had 4 or more sexual partners during lifetime.

De SanJosé et al. (2007) demonstrated, in a meta-analysis study, that HPV prevalence was highest in women younger than 35 years old. Young age is an established independent factor associated to HPV infection (Cosser et al., 2016), due to a potential more intense sexual activity and also to cervical ectopy, a physiological change common at this age leads to HPV infection by rapid rate of metaplastic changes and the incomplete immune responses (Hwang et al., 2012; Zitkute & Bumbuliene, 2016). Moreover anovulatory cycles lead to inadequate production of cervical mucus, which is an important protective barrier against infectious agents (Zitkute & Bumbuliene, 2016).

A meta-analysis based upon 57 studies found that there was a 2-fold increased risk of invasive cervical cancer among individuals of low social status compared with individuals of high social status (Parikh et al., 2003).

Several studies showed that cigarette smoking is associated with HPV prevalence (Vaccarella et al., 2008), incidence (Minkoff et al., 2004), and persistence (Koshiol et al., 2006). Has been demonstrated that women who smoke are about twice as likely as nonsmokers to get cervical cancer and that the cervical mucus of smokers contains measurable amounts of cigarette constituents and their metabolites (Xi et al., 2009).

Ribeiro et al. (2015) and Baudu et al. (2014) also reported a significant association among women who had their first sexual intercourse prior to 16 years of age and HPV infection. Sexual life with lots of different partners also increases chances of coming into contact with a person who is carrying the HPV. Some studies showed that women, who had during their life two or more partners, have twice higher prevalence of HPV than those who had only one partner (Bahmanyar et al., 2012; WHO, 2008).

When compared to no cervical lesions group as reference, HSIL were more frequent in women receiving 1 minimum wage or less. What is in accordance to previous studies which postulated that individuals with lower socioeconomic status, including lower levels of education and low income, may be more likely to engage in higher risk sexual activity or have delayed access to medical screening services, leading to higher exposure and infection rates (Parkin & Bray, 2006; Bernard et al., 2008).

To best of our knowledge this is the third study to investigate *CCR5* rs333 polymorphism influence in HPV infection and squamous intraepithelial lesions. No significant difference in *CCR5* rs333 genotypes and alleles' distribution according to HPV infection was observed and it was not associated to cervical lesions development among HPV infected women from North Region of Paraná, Brazil. Although a tendency for  $\Delta 32$  allele presence was observed regarding HPV infection.

The first study was conducted by Zheng et al. (2006) in a Swedish cervical cancer population, and they observed that individuals with the  $\Delta 32/\Delta 32$  genotype presented an increased risk of 4.58 (CI 0.40-52.64,  $p=0.045$ ) for HPV positivity. However in Zheng study the observed association may be questioned since the confidence interval is wide and it overlaps the null value. The 95% confidence interval (CI) is used to estimate the precision of the odds ratio (OR), and a large CI indicates a low level of precision of the OR, whereas a small CI indicates a higher precision of the OR. It is important to note however, that the 95% CI does not report a measure's statistical significance. In practice, the 95% CI is often used as a proxy for the presence of statistical significance if it does not overlap the null value (e.g. OR=1) (Szumila, 2010).

The second study was conducted by Santos et al. (2016) in Northeast Region of Brazil, while the present study was conducted in the South Region of Brazil, which presents a different ethnic background, although Brazilian population is characterized by an intense ethnic mixture. Santos et al. only investigated the association between *CCR5* rs333 polymorphism and cervical lesions development and they did not observe any association of  $\Delta 32$  allele variant with development of cervical lesion (OR = 1.54, CI95% 0.67-3.54,  $p=0.405$ ).

Singh et al. (2008) also evaluated the association between *CCR5* rs333 polymorphism and cervical cancer development and reported that *CCR5* heterozygous

genotype may significantly influence the early stage of cervical cancer development (OR = 4.43; p=0.021).

Cytokines, chemokines, their receptors and free radicals initiate and perpetuate inflammatory responses, therefore gene polymorphisms or genetic variations in immune related genes might be related to HPV persistence and progression to cancer (Moss & Blaser, 2005). Moreover, CCR5 may have an indirect effect on cancer progression by controlling the antitumor immune response (Mañes et al., 2003) since it is involved in the chemotaxis of leukocytes towards inflammatory sites (Baggiolini, 1998) but it has been suggested that CCR5 has a far more important role in the immune response than in regulating the trafficking of immune cells (Weiss et al., 2011).

In this context, CCR5 expression on CD8+ T cells was necessary for their efficient activation and migration to the tumor site and for tumor killing; importantly, CCR5 must also be expressed by CD4+ T lymphocytes to achieve maximal CD8+ T cell effector function (Gonzalez-Martin et al., 2012). Furthermore successful regression of HPV infection occurs in the presence of local pro-inflammatory (Th1) cytokine expression (Scott et al., 1999; Scott et al., 2001; Song et al., 2008), and it is known that CCR5 drives the immune response towards the Th1 pattern (Loetscher et al., 1998).

However, the exact mechanism of the clearance of HPV infection remains unclear. HPV persistence is considered to require a tolerant local immune environment, favoring evasion of the virus or the suppression of the innate and adaptive immune responses (Kemp et al., 2010).

## **5. CONCLUSION**

Since CCR5 may contribute to antiviral response, cervical lesions development and cancer progression by controlling the antitumor immune response and rs333 polymorphism is not a very frequent polymorphism, it should be assessed in order to establish its real influence on HPV infection and squamous intraepithelial lesions development.

Table 1  
**Socio-demographic and clinical characteristics of HPV non-infected and infected patients**

Variable	HPV non-infected		HPV infected		p value
	n*	(%)	n*	(%)	
<b>Self-Reported Ethnicity</b>					0.317
Caucasian	94	(52.2)	71	(46.7)	
Non-caucasian	86	(47.8)	81	(53.3)	
<b>Age (years)</b>					< 0.001
≤ 34	55	(30.1)	85	(52.1)	
35 – 54	98	(53.6)	59	(36.2)	
≥ 55	30	(16.3)	19	(11.7)	
<b>Educational level<sup>a</sup></b>					0.981
Incomplete fundamental education	55	(30.6)	48	(31.6)	
Complete fundamental education	22	(12.2)	17	(11.2)	
Incomplete secondary education	28	(15.6)	25	(16.4)	
Complete secondary education	56	(31.1)	48	(31.6)	
Incomplete higher education	6	(3.3)	6	(3.9)	
Complete higher education	13	(7.2)	8	(5.3)	
<b>Monthly income<sup>b</sup></b>					0.002
<1 minimum wage	43	(23.9)	62	(42.2)	
1 – <3 minimum wages	124	(68.9)	74	(50.4)	
3 – <5 minimum wages	8	(4.4)	10	(6.8)	
5 – <7 minimum wages	4	(2.2)	0	(0.0)	
≥ 7 minimum wages	1	(0.6)	1	(0.6)	
<b>Marital status</b>					0.001
Single	18	(9.8)	43	(26.2)	
Married / Civil partner	132	(71.7)	90	(54.9)	
Divorced	23	(12.5)	22	(13.4)	
Widowed	11	(6.0)	9	(5.5)	
<b>Smoking status</b>					0.007
No	153	(83.6)	113	(71.5)	
Yes	30	(16.4)	45	(28.5)	
<b>Knowledge about HPV</b>					0.163
No	33	(18.1)	39	(25.5)	
Have ever heard	104	(57.2)	73	(47.7)	
Yes	45	(24.7)	41	(26.8)	

Analysis by two-sided Chi-square ( $\chi^2$ ) test and ( $p < 0.05$  as significance level).

<sup>a</sup>Based on Brazilian educational system.

<sup>b</sup>Based on Brazilian minimum wage (approximately US\$ 250.00).

\* For socio-demographic characteristics analysis between HPV non-infected and infected patients not all 349 patients were included, with variations depending on the characteristic analyzed.

Table 2  
**Categoric reproductive and sexual behavioral characteristics of HPV non-infected and infected patients**

Variable	HPV non-infected		HPV infected		p value
	n*	(%)	n*	(%)	
<b>Hormonal contraceptive method</b>					0.140
No	124	(68.9)	98	(61.3)	
Yes	56	(31.1)	62	(38.8)	
<b>Condom</b>					0.626
No	159	(87.8)	129	(84.9)	
Yes	22	(12.2)	23	(15.1)	
<b>Age at first sexual intercourse (years)</b>					<b>0.038</b>
≤17	95	(51.6)	101	(62.7)	
≥18	89	(48.4)	60	(37.3)	
<b>Age at menarche (years)</b>					0.589
≤12	89	(48.6)	83	(51.6)	
≥13	94	(51.4)	78	(48.4)	
<b>Sexual partners during lifetime</b>					<b>0.001</b>
1	74	(40.7)	36	(23.7)	
2 – 3	57	(31.3)	48	(31.6)	
≥4	51	(28.0)	68	(44.7)	

Analysis by two-sided Chi-square ( $\chi^2$ ) test ( $p < 0.05$  as significance level).

\* For reproductive and sexual behavioral characteristics analysis between HPV non-infected and infected patients not all 349 patients were included, with variations depending on the characteristic analyzed.

Table 3  
**Continue reproductive and sexual behavioral characteristics of HPV non-infected and infected patients**

Variable	HPV non-infected		HPV infected		p value
	mean	(SD)	mean	(SD)	
<b>Age at Menarche</b>	12.77	1.948	12.63	1.724	0.493
<b>First sexual intercourse age</b>	<b>17.85</b>	<b>3.190</b>	<b>16.84</b>	<b>3.542</b>	<b>0.006</b>
<b>Pregnancies number</b>	2.45	1.400	2.2	1.740	0.134
<b>Delivery number</b>	2.32	1.200	2.36	1.552	0.754
<b>Abortion number</b>	0.33	0.703	0.26	0.559	0.339
<b>Sexual partners number in the past 6 months</b>	0.88	0.661	0.94	0.612	0.443

Analysis by t Test ( $p < 0.05$  as significance level).

Table 4  
**Socio-demographic, reproductive and sexual behavioral characteristics of HPV infected patients according to cervical intraepithelial lesions**

Variable	NSIL		LSIL		HSIL		p value
	n*	(%)	n*	(%)	n*	(%)	
<b>Age (years)</b>							0.897
≤ 34	41	(51.9)	12	(52.2)	30	(55.6)	
35 – 54	28	(35.4)	09	(39.1)	20	(37.0)	
≥ 55	10	(12.7)	02	(8.7)	04	(7.4)	
<b>Monthly income<sup>b</sup></b>							<b>0.002</b>
<1 minimum wage	24	(31.6)	06	(27.3)	28	(65.1)	
1 – <3 minimum wages	44	(57.9)	14	(63.6)	15	(34.9)	
3 – <5 minimum wages	08	(10.5)	02	(9.1)	00	(0.0)	
≥ 5 minimum wages	00	(0.0)	00	(0.0)	00	(0.0)	
<b>Marital status</b>							0.479
Single	21	(26.5)	05	(20.8)	17	(31.5)	
Married / Civil partner	45	(57.0)	12	(50.0)	29	(53.7)	
Divorced	10	(12.7)	04	(16.7)	07	(13.0)	
Widowed	03	(3.8)	03	(12.5)	01	(1.8)	
<b>Smoking status</b>							0.198
No	61	(79.2)	15	(65.2)	34	(66.7)	
Yes	16	(20.8)	07	(34.8)	17	(33.3)	
<b>Age at first sexual intercourse (years)</b>							0.280
≤17	45	(57.0)	15	(68.2)	37	(69.8)	
≥18	34	(43.0)	07	(31.8)	16	(30.2)	
<b>Sexual partners during lifetime</b>							0.210
1	24	(31.2)	05	(21.8)	06	(13.3)	
2 – 3	20	(26.0)	09	(39.1)	16	(35.6)	
≥4	33	(42.8)	09	(39.1)	23	(51.1)	

Analysis by two-sided Chi-square ( $\chi^2$ ) test ( $p < 0.05$  as significance level). SIL: squamous intraepithelial lesion; NSIL: non-squamous intraepithelial lesion; LSIL: low-grade squamous intraepithelial lesion; HSIL: high-grade squamous intraepithelial lesion.  
 \* For socio-demographic, reproductive and sexual behavioral characteristics analysis among cervical lesions distribution in HPV infected patients not all 164 patients were included, with variations depending on the characteristic analyzed.

Table 5  
**Association between CCR5 rs333 polymorphism and HPV infection**

CCR5 - Genotypes rs333	HPV non-infected (n = 185) <sup>a</sup>		HPV infected (n = 164) <sup>b</sup>		OR	CI <sub>95%</sub>	p value
	n	(%)	n	(%)			
<b>Codominant Model</b>							
CCR5/CCR5	174	(94.1)	146	(89.0)	1.000	Reference	
CCR5/Δ32	11	(5.9)	17	(10.4)	1.842	0.836 – 4.057	0.130
Δ32/ Δ32	0	(0.0)	1	(0.6)	NA	NA	NA
<b>Dominant Model</b>							
CCR5/CCR5	174	(94.1)	146	(89.0)	1.000	Reference	
CCR5/ Δ32 + Δ32/ Δ32	11	(5.9)	18	(11.0)	1.950	0.892 – 4.261	0.094
<b>Alleles</b>							
CCR5	359	(97.03)	309	(94.21)	1.000	Reference	
Δ32	11	(2.97)	19	(5.19)	2.007	0.941 – 4.282	0.072

Analysis by Odds Ratio ( $p < 0.05$  as significance level).

OR = Odds Ratio; CI = Confidence Interval. <sup>a</sup>  $\chi^2$  in HWE=0.092,  $p > 0.05$ ; <sup>b</sup>  $\chi^2$  in HWE=0.1833,  $p > 0.05$ .

NA = Not available

Recessive model was not performed due to the low number of Δ32/Δ32 genotype women.

Table 6  
**Distribution of CCR5 Genotypes by Lesion Grade among HPV infected women**

CCR5 genotype	NSIL <sup>a</sup> (N = 79)		LSIL <sup>b</sup> (N = 24)		HSIL <sup>c</sup> (N = 54)		p value*
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
CCR5 rs333							0.167
CCR5/CCR5	72	(91.1)	19	(79.2)	50	(92.6)	
Δ32 carrier	7	(8.9)	5	(20.8)	4	(7.4)	

\*By two-sided  $\chi^2$  test, with  $p < 0.05$  considered significant.

<sup>a</sup>No lesion, <sup>b</sup>low-grade squamous intraepithelial lesion, and <sup>c</sup>high-grade squamous intraepithelial lesion.

## REFERENCES

- Baggiolini, M. (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, 392(6676), 565-568. 1998.
- Bahmanyar, E. R., Paavonen, J., Naud, P., Salmerón, J., Chow, S. N., Apter, D., . . . HPV PATRICIA Study Group. (2012). Prevalence and risk factors for cervical HPV infection and abnormalities in young adult women at enrolment in the multinational PATRICIA trial. *Gynecology Oncology*, 127(3), 440-450.
- Baudu, A., Prétet, J. L., Riethmuller, D., Chotard, M., Mougin, C., & Mercier, M. (2014). Prevalence and risk factors of human papillomavirus infection types 16/18/45 in a cohort of French females aged 15–23 years. *Journal Epidemiology Glob Health*, 4, 35-43.

- Bauer, H. M., Ting, Y., Greer, C. E., Chambers, J. C., Tashiro, C. J., Chimera, J., . . . Manos, M. M. (1991). Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 265(4), 472–477.
- Sharma, A., & Sheth, J. N. (2004, July). Web-based marketing: The coming revolution in marketing thought and strategy. *Journal of Business Research*, 57(7), 696-702.
- Benard, V. B., Johnson, C. J., Thompson, T. D., Roland KB, Lai SM, Cokkinides V, . . . Weir, H. K. (2008). Examining the association between socioeconomic status and potential human papillomavirus-associated cancers. *Cancer*, 113(10 Suppl): 2910-2918.
- Berti, F. C. B., Pereira, A. P. L., Cebinelli, G. C. M., Trugilo, K. P., & Oliveira, K. B. (2017). The role of interleukin 10 in human papilloma virus infection and progression to cervical carcinoma. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 34,1-13.
- Coser, J., Boeira, T. R., Wolf, J. M., Cerbaro, K., Simon, D., Lunge, V. R. (2016) Cervical human papillomavirus infection and persistence: a clinic-based study in the countryside from South Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 20, 61-68.
- De Sanjosé, S., Diaz, M., Castellsagué, X., Clifford, G., & Bruni, L., & Muñoz N, & Bosch, F. X. (2007). Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infectious Diseases*, 7, 453-459.
- Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G. A., Smith, M. W., Allikmets R, ... O'Brien, S. J. (1996). Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele 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*, 273,1856–1862.
- Faridi, R., Zahra, A., Khan, K., & Idrees M. Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virology Journal*, 8(269), 1–8.
- Gonzalez-Martin, A., Mira, E., & Manes, S. (2012). CCR5 in cancer immunotherapy: more than an, “attractive” receptor for Tcells. *Oncoimmunology*, 1,106-108.
- Guergnon, J., & Combadière, C. (2012). Role of chemokines polymorphisms in diseases. *Immunology Letters*, 145(1-2), 15–22.
- Huang, Y., Paxton, W. A., Wolinsky, S. M., Neumann, A. U., Zhang, L., He, T., . . . Koup, R. A. (1996). The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nature Medicine*, 2(11),1240–1243.
- Hwang, L. Y., Lieberman, J. A., Ma, Y., Farhat, S., & Moscicki, A. B. (2012). Cervical ectopy and the acquisition of human papillomavirus in adolescents and young women. *Obstetrics and Gynecology*, 119, 1164–1170.

- Kemp, T. J., Hildesheim, A., Garcia-Piñeres, A., Williams, M. C., Shearer, G. M., Rodriguez, A. C., . . . Pinto, L. A. (2010). Elevated systemic levels of inflammatory cytokines in older women with persistent cervical HPV infection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention*, 19(8), 1954-1959.
- Koshiol, J., Schroeder, J., Jamieson, D. J., Marshall, S. W., Duerr, A., Heilig, C. M., . . . Smith, J. S. (2006). Smoking and time to clearance of human papillomavirus infection in HIV-seropositive and HIV-seronegative women. *American Journal of Epidemiology*, 164, 176-183.
- Liu, R., Paxton, W. A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S. R., Horuk, R., . . . Landau, N. R. (1996). Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*, 86, 367-377.
- Loetscher, P., Ugucioni, M., Bordoli, L., Baggiolini, M., Moser, B., Chizzolini, C., & Dayer, J. M. (1998). CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature*. 391(6665), 344-345.
- Mañes, S., Mira, E., Colomer, R., Montero, S., Real, L. M., Gómez-Moutón, C., . . . Martínez, A. C. (2003). CCR5 expression influences the progression of human breast cancer in a p53- dependent manner. *Journal of Experimental Medicine*, 198(9), 1381-1389.
- Minkoff, H., Feldman, J. G., Strickler, H. D., Heather, D. W., Bacon, M. C., Levine, A., . . . Anastos, K. (2004). Relationship between smoking and human papillomavirus infections in HIV-infected and -uninfected women. *Journal of Infectious Diseases*, 189, 1821-1828.
- Moss, S. F. & Blaser, M. J. (2005). Mechanisms of disease: Inflammation and the origins of cancer. *Nature Clinical Practice Oncology*, 2(2), 90-97.
- Okuyama, N. C. M., Santos, F. C., Trugilo, K. P., Oliveira, K. B. (2016). Involvement of CXCL12 Pathway in HPV-related Diseases. *Aims Medical Science*, 3(4), 417-440.
- Oliveira, C. E. C., Oda, J. M. M., Guembarovski, R. L., Brajão de Oliveira, K, Ariza CB, Neto, J. S., . . . Watanabe, M. A. E. (2014). CC chemokine receptor 5: The interface of host immunity and cancer. *Disease Markers*, 2014, 1-8.
- Oliveira, K. B., Reiche, E. M. V., Morimoto, H. K., Fungaro, M. H. P., Estevão, D., Pontello, R., . . . Watanabe, M. A. E. (2007). Analysis of the CC chemokine receptor 5 delta32 polymorphism in a Brazilian population with cutaneous leishmaniasis. *Journal of Cutaneous Pathology*. 34(1), 27-32.
- Parikh, S., Brennan, P., Boffetta, P. (2003). Meta-analysis of social inequality and the risk of cervical cancer. *International Journal of Cancer*, 105, 687-691.
- Parkin, D. M., & Bray, F. (2006). The burden of HPV-related cancers. In: Bosch, F. X., Cuzick, J., Schiller, J. T., Garnett, G. P., Meheus, A., Franco, E. L., & Wright, T., (Eds.). *Vaccine: HPV Vaccines and Screening in the Prevention of Cervical Cancer*. (pp. S1-S264). Amsterdam: Elsevier Ltd.

- Ribeiro, A. A., Costa, M. C., Alves, R. R., Villa, L. L., Saddi, V. A., Carneiro, M. A. . . . Rabelo-Santos, S. H. (2015). HPV infection and cervical neoplasia: associated risk factors. *Infect Agent Cancer*, 10, 16.
- Rossi, D., & Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annual Review Immunology*, 18, 217-242.
- Santos, E. U., Lima, G. D., Oliveira, M. de L., Heráclio, S. de A., Silva, H. D., Crovella, S., . . . Souza, P. R. (2016). CCR2 and CCR5 genes polymorphisms in women with cervical lesions from Pernambuco, Northeast Region of Brazil: a case-control study. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 111(3), 174-80.
- Scott, M., Nakagawa, M., & Moscicki, A. B. (2001). Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8, 209-220.
- Scott, M., Stites, D. P., & Moscicki, A. B. (1999) Th1 cytokine patterns in cervical human papillomavirus infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6, 751-755.
- Singh, H., Sachan, R., Jain, M., & Mittal, B. (2008). CCR5-Delta32 polymorphism and susceptibility to cervical cancer: association with early stage of cervical cancer. *Oncology Reserch*, 17(2), 87-91.
- Song, S. H., Lee, J. K., Lee, N. W., Saw, H. S., Kang, J. S. & Lee, K. W. (2008). Interferon-gamma (IFN-gamma): a possible prognostic marker for clearance of high-risk human papillomavirus (HPV). *Gynecologic Oncology*, 108, 543-548.
- Szumila, M. (2010). Explaining Odds Ratios. *Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 19(3): 227–229.
- Vaccarella, S., Herrero, R., Snijders, P. J., Dai, M., Thomas, J. O., Hieu, N.T., . . . Franceschi S. (2008). Smoking and human papillomavirus infection: pooled analysis of the International Agency for Research on Cancer HPV Prevalence Surveys. *International Journal of Epidemiology*, 37(3): 536-546.
- Weiss, E. M., Schmidt, A., Vobis D. Garbi, N., Lahl, K., Mayer, C. T., Sparwasser, T., . . . Krammer, P. H. (2011). Foxp3-mediated suppression of CD95l expression confers resistance to activation- induced cell death in regulatory Tcells. *Journal of Immunology*, 187(4), 1684–1691.
- Xi, L. F., Koutsky, L. A., Castle, P. E., Edelstein, Z. R., Meyers, C., Ho, J., & Schiffman, M. (2009). Relationship Between Cigarette Smoking and Human Papilloma Virus Types 16 and 18 DNA Load. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, 18(12), 3490-3496.
- Zheng, B., Wiklund, F., Gharizadeh, B., Sadat, M., Gambelunghe, G., Hallmans, G., . . . Ghaderi, M. (2006). Genetic polymorphism of chemokine receptors CCR2 and CCR5 in Swedish cervical cancer patients. *Anticancer Research*, 26(5B), 3669-3674.

Zitkute, V., & Bumbuliene, Z. (2016). Risk Factors Affecting HPV Infection, Persistence and Lesion Progression in Women and Men. *Clinical Research in Infectious Diseases*, 3, 2–5.

## 5 CONCLUSÕES DOS ARTIGOS

### 5.1 ARTIGO 1

- Quanto às características sociodemográficas, de comportamento sexual e ginecológicas e obstétricas, observou-se maior prevalência do vírus entre mulheres com idade menor que 25 anos, solteiras, que recebiam até um salário mínimo, tabagistas, que tiveram sexarca antes dos 18 anos de idade, que tiveram 4 ou mais parceiros sexuais durante a vida e que nunca gestaram. Infecção por *C. trachomatis* foi maior em pacientes HPV positivas. Embora estatisticamente não significativo, este resultado apresentou tendência.
- Idade menor que 25 anos foi um fator de risco independente associado à infecção pelo HPV, enquanto estado civil casada ou com parceiro fixo e renda mensal de 1 a 3 salários mínimos foram independentemente associados à proteção contra a infecção por este vírus.
- Quanto à presença de anormalidades citológicas diagnosticadas nas pacientes HPV positivas, tabagismo, renda mensal de até um salário mínimo e aborto foram associados ao desenvolvimento de lesões intraepiteliais escamosas.
- Renda mensal de 1 a 3 salários mínimos foi direta e independentemente associada à proteção contra o desenvolvimento de lesões intraepiteliais escamosas.

### 5.2 ARTIGO 2

- Quanto às características sociodemográficas, reprodutivas e sexuais, observou-se que as mulheres infectadas pelo HPV foram significativamente mais jovens do que as não infectadas, com maior frequência de infecção observada dentre mulheres com idade inferior a 34 anos, solteiras, que recebem um salário mínimo ou menos, tabagistas, cuja sexarca ocorreu antes dos 17 anos de idade e que tiveram 4 ou mais parceiros sexuais durante a vida.
- Não foi observada diferença significativa na distribuição genotípica e alélica do polimorfismo rs333 de CCR5 em relação à infecção pelo HPV ou ao desenvolvimento de lesões cervicais entre mulheres infectadas pelo HPV, embora a presença do alelo  $\Delta 32$  tenha apresentado tendência em relação à infecção pelo HPV.



## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Nossos resultados sugerem que a idade, o estado civil e a renda mensal são cofatores importantes para a infecção pelo HPV e desenvolvimento da LIE em mulheres residentes na região Norte do Paraná. Contudo devido ao fato do rs333 do *CCR5* ser um polimorfismo pouco frequente na população, e possuir importante papel na resposta imune antiviral e antitumoral, maiores estudos são necessários para estabelecer o envolvimento deste polimorfismo na infecção pelo HPV e no desenvolvimento de lesões intraepiteliais escamosas.

## REFERÊNCIAS

- AMEDEI, A.; PRISCO, D.; D'ELIOS, M. M. The use of cytokines and chemokines in the cancer immunotherapy. **Recent patents on anti-cancer drug discovery**, Saif Zone, v. 8, n. 2, p. 126–142, May 2013.
- ANZALA, A. et al. CCR2-64I allele and genotype association with delayed AIDS progression in African women. **The Lancet, London**, v. 351, n. 9116, p. 1632-1633, May 1998.
- BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, London, v. 392, n. 6676, p. 565-568, Apr. 1998.
- BAGGIOLINI, M. Chemokines in pathology and medicine. **Journal of Internal Medicine**, Oxford, v. 250, n. 2, p. 91-104, Dec. 2001.
- BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Human chemokines: an update. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 15, p. 675-705, Dec. 1997.
- BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines: CXC and CC chemokines. **Advances in Immunology**, New York, v. 55, p. 97-179, 1994.
- BARBIERI, F. et al. CXC receptor and chemokine expression in human meningioma: SDF1/CXCR4 signaling activates ERK1/2 and stimulates meningioma cell proliferation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1090, n. 1, p. 332-343, Dec. 2006.
- BARMANIA, F.; PEPPER, M. S. C-C chemokine receptor type five (CCR5): an emerging target for the control of HIV infection. **Applied & Translational Genomics**, Amsterdam, v. 2, p. 3-16, Dec. 2013.
- BAUER, H. M. et al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 265, n. 4, p. 472–477, Jan. 1991.
- BAZAN, J. F. et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C. **Nature**, London, v. 385, n. 6617, p. 640-644, Feb. 1997.
- BIRDWELL, C. E. et al. Genome-wide DNA methylation as an epigenetic consequence of Epstein-Barr virus infection of immortalized keratinocytes. **Journal of Virology**, Washington, v. 88, n. 19, p.11442-1458, Oct. 2014. doi: 10.1128/JVI.00972-14.
- BLACK, C. M. Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 10, n. 1, p. 160–184, Jan. 1997.

BRAATEN, K. P.; LAUFER, M. R. Human papillomavirus (HPV), HPV-related disease, and the HPV vaccine. **Reviews in Obstetrics & Gynecology**, New York, v. 1, n. 1, p. 2-10, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção, e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. **DST no Brasil**. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/dst-no-brasil>>. Acesso em: 17 mar. 2011.

BZHALAVA, D.; EKLUND, C.; DILLNER, J. International standardization and classification of human papillomavirus types. **Virology**, New York, v. 476, p. 341-344, Feb. 2015.

CASTELLSAGUÉ, X.; BOSCH, F. X.; MUÑOZ, N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. **Virus Research**, Amsterdam, v. 89, n. 2, p. 191–199, Nov. 2002.

CASTELLSAGUÉ, X.; MUÑOZ, N. Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis: role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, Oxford, v. 2003, n. 31, p. 20-28, June 2003.

CATTANI, P. et al. Clinical performance of human papillomavirus E6 and E7 mRNA testing for high-grade lesions of the cervix. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 47, n. 12, p. 3895-3901, Dec. 2009.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Chlamydia**: CDC Fact Sheet. 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/std/chlamydia/STDFact-Chlamydia.htm>>. Acesso em: 15 out. 2017.

CHANG, H. Y. et al. Association between CCR5 promoter polymorphisms and hepatitis B virus infection. **The Korean Journal of Hepatology**, Seoul, v. 11, n. 2, p. 116-124, June 2005.

CHENSUE, S. W. Molecular machinations: chemokine signals in host-pathogen interactions. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 4, p. 821-835, Oct. 2001.

CHIES, J. A.; HUTZ, M. H. High frequency of the CCR5delta32 variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 36, n. 1, p. 71-75, jan. 2003.

CHOW, M. T.; MÖLLER, A.; SMYTH, M. J. Inflammation and immune surveillance in cancer. **Seminars in Cancer Biology**, Philadelphia, v. 22, n. 1, p. 23–32, Feb. 2012.

CLARK-LEWIS, I. et al. Structure-activity relationships of chemokines. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 57, n. 5, p. 703-711, May 1995.

CLERICI, M. et al. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. **Journal of the National Cancer Institute**, Washington, v. 89, n. 3, p. 245-250, Feb. 1997.

- CODES, J. S. et al. Detecção de doenças sexualmente transmissíveis em clínica de planejamento familiar da rede pública no Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 101-106, mar. 2002.
- CODES, J. S. et al. Detecção de doenças sexualmente transmissíveis e não clínicas na cidade de Salvador, Bahia, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 2, p. 325-334, fev. 2006.
- DEAN, M. et al. 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**, New York, v. 273, n. 5283, p. 1856-1862, Sep. 1996.
- DEBATTISTA, J. et al. Detection of Chlamydia trachomatis in an Australian high school student population. **Sexually Transmitted Infections**, London, v. 78, n. 3, p. 194-197, June 2002.
- DEFAUX, A. B. et al. Human papillomavirus infection of the cervix uteri in women attending a Health Examination Center of the French social security. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 73, n. 2, p. 262-268, June 2004.
- DELIGEOROGLOU, E. et al. HPV infection: immunological aspects and their utility in future therapy. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 2013, p. 1-9, Aug. 2013.
- DI FELICE, V. et al. Is Chlamydia I heat shock protein 60 a risk factor for oncogenesis? **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 62, n. 1, p. 4-9, Jan. 2005.
- DOCHEZ, C. et al. HPV vaccines to prevent cervical cancer and genital warts: an update. **Vaccine**, Amsterdam, v. 32, n. 14, p. 1595-1601, Mar. 2014.
- DOORBAR, J. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, Amsterdam, v. 30, p. 55-70, Nov. 2012. Supp. 5.
- DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical science**, London, v. 110, n. 5, p. 525-541, May 2006.
- DOORBAR, J. The E4 protein: structure, function and patterns of expression. **Virology**, New York, v. 445, n. 1-2, p. 80-98, Oct. 2013.
- DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 32, p. 7-15, Mar. 2005. Supp. 1.
- DRANOFF, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 4, n. 1, p. 11-22, Jan. 2004.
- EVANS, E. M. et al. Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. **Cancer Research**, Chicago, v. 57, n. 14, p. 2943-2950, July 1997.

FEDRIZZI, E. N. et al. Infecção pelo papilomavírus humano (HPV) em mulheres de Florianópolis, Santa Catarina. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 2, p. 73-79, 2008.

FEHRMANN, F. et al. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 77, n. 5, p. 2819-2831, Mar. 2003.

FERLAY, J. et al. **Globocan 2002**: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. Lyon: IARC, 2004. (CancerBase, n. 5, p. 123-129).

FERNANDES, J. V. et al. Link between chronic inflammation and human papillomavirus-induced carcinogenesis (review). **Oncology Letters**, Athens, v. 9, n. 3, p. 1015-1026, Mar. 2015.

FRIAS, M. C. A. A. et al. Frequência de Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum e Mycoplasma hominis na endocérvice de mulheres no menacme. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 3, p. 5-22, 2001.

GANGULY, N.; PARIHAR, S. P. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 34, n. 1, p. 113-123, Mar. 2009.

GHADERI, M. et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$ -11 and DR15-DQ6 (B\*0602) haplotype increase the risk for cervical intraepithelial neoplasia in human papillomavirus 16 seropositive women in Northern Sweden. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, Philadelphia, v. 9, n. 10, p. 1067-1070, Oct. 2000.

GUIDRY, J. T., SCOTT, R. S. The Interaction Between Papillomavirus and Other Viruses. **Virus Research**, Amsterdam, v. 2, n. 231, p.139-147, Mar. 2017. doi: 10.1016/j.virusres.2016.11.002.

HARIRI, S.; WARNER, L. Condom use and human papillomavirus in men. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 208, n. 3, p. 367-369, Aug. 2013.

HARKINS, A. L.; MUNSON, E. Molecular diagnosis of sexually transmitted Chlamydia trachomatis in the United States. **ISRN Obstetrics and Gynecology**, New York, p. 1-17, 2011.

HEBNER, C. M.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Reviews in Medical Virology**, Chichester, v. 16, n. 2, p. 83-97, Mar./Apr. 2006.

HO, G. Y. et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 338, n. 7, p. 423-428, Feb. 1998.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Human papillomavirus (HPV) infection**. Lyon: IARC, 2007. v. 90.

IGIETSEME, J. U. et al. Role of epithelial-mesenchyme transition in Chlamydia pathogenesis. **Public Library of Science One**, San Francisco, v. 10, n. 12, p. 1-26, Dec. 2015.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2016**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015.

JIT, M. et al. Estimating progression rates for human papillomavirus infection from epidemiological data. **Medical Decision Making**, Cambridge, v. 30, n. 1, p. 84-98, Jan./Feb. 2010.

JOHANSSON, C.; SCHWARTZ, S. Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 11, n. 4, p. 239-251, Apr. 2013.

KENNEDY, J. et al. Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 155, n. 1, p. 203-209, July 1995.

KHATTAK F. et al. Mathematical Modeling of E6-p53 interactions i Cervical Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Bangkok, v. 18, n. 4, p. 1057-1061, Apr. 2017

KIM, J. et al. Human papillomavirus genotypes and cofactors causing cervical intraethelial neoplasia and cervical câncer in Korean women. **International Journal of Gynecological Cancer**, Cambridge, v. 22, n. 9, p.1570-1576, Nov. 2012. doi: 10.1097/IGC.0b013e31826aa5f9.

KIM, M. K. et al. Human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein as a new target for cervical cancer treatment. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 80, n. 12, p. 1930-1935, Dec. 2010.

KIRNBAUER, R. et al. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 89, n. 24, p. 12180-12184, Dec. 1992.

KJAER, S. K. et al. Human papillomavirus infection in Danish female sex workers: decreasing prevalence with age despite continuously high sexual activity. **Sexually Transmitted Diseases**, Philadelphia, v. 27, n. 8, p. 438-445, Sep. 2000.

KOBAYASHI, A. et al. Regulatory cells are involved in local immunosuppression in cervical cancer. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 65, n. 9, p. 624–625, May 2005.

LAM, J. U. et al. Condom use in prevention of human papillomavirus infections and cervical neoplasia: systematic review of longitudinal studies. **Journal of Medical Screening**, London, v. 21, n. 1, p. 38-50, Mar. 2014.

LAND, J. A. et al. Epidemiology of Chlamydia trachomatis infection in women and the costeffectiveness of screening. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 16, n. 2, p. 189–204, Mar./Apr. 2010.

LEBOUTE, A. P.; CARVALHO, M. W.; SIMÕES, A. L. Absence of the *deltaccr5* mutation in indigenous populations of the Brazilian Amazon. **Human Genetics**, Berlin, v. 105, n. 5, p. 442-443, Nov. 1999.

LENSKI, R. E. Evolution of plague virulence. **Nature**, London, v. 334, n. 6182, p. 473-474, Aug. 1988.

LIBERT, F. et al. The delta CCR5 mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 7, n. 3, p. 399-406, Mar. 1998.

LINDLEY, I. J. D.; WESTWICK, J.; KUNKEL, S. L. Nomenclature announcement: the chemokines. **Immunology Today**, Cambridge, v. 14, p. 24-27, 1993.

LIU, R. et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. **Cell**, Cambridge, v. 86, n. 3, p. 367-377, Aug. 1996.

LODI, P. J. et al. High-resolution solution structure of the beta chemokine hMIP-1 beta by multidimensional NMR. **Science**, New York, v. 263, n. 5154, p. 1762-1767, Mar. 1994.

LOETSCHER, P. et al. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. **Nature**, London, v. 391, n. 6665, p. 344-345, Jan. 1998.

LUSTER, A. D. Chemokines: chemotactic cytokines that mediate inflammation. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 338, n. 7, p. 436-445, Feb. 1998.

MARANGON, A. V. et al. The association of the immune response genes to human papillomavirus-related cervical disease in a Brazilian population. **BioMed Research International**, New York, v. 2013, p. 1-11, 2013.

MARQUES, C. A. S.; MENEZES, M. L. B. Infecção genital por Chlamydia trachomatis e esterilidade. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 1, p. 66-70, 2005.

MARTINSON, J. J. et al. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. **Nature Genetics**, New York, v. 16, n. 1, p. 100-103, May 1997.

MARTINSON, J. J. et al. Global distribution of the CCR2-64I/CCR5-59653T HIV-1 disease-protective haplotype. **AIDS**, London, v. 14, n. 5, p. 483-489, Mar. 2000.

MCNICHOLL, J. M. et al. Host genes and HIV: the role of the chemokine receptor gene CCR5 and its allele. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 3, n. 3, p. 261-271, July/Sep. 1997.

MELLES, H. H. B. et al. Avaliação de parâmetros para o diagnóstico laboratorial de infecção genital feminina pela Chlamydia trachomatis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 33, n. 4, p. 355-361, ago. 2000.

MODIS, Y.; TRUS, B. L.; HARRISON, S. C. Atomic model of the papillomavirus capsid. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 21, n. 18, p. 4754-4762, Sep. 2002.

- MONROY, V. S.; MATA, A. E. T.; MAGDALENO, J. A. V. Diagnóstico de infección por *Chlamydia trachomatis* mediante PCR em pacientes que acuden a la Clínica de Especialidades de la Mujer de La Secretaría de la Defensa Nacional. **Ginecología y Obstetricia de México**, Ciudad de México, v. 77, n. 1, p. 13-18, enero 2009.
- MOODLEY, M. et al. The role of steroid contraceptive hormones in the pathogenesis of invasive cervical cancer: a review. **International Journal of Gynecological Cancer**, Cambridge, v. 13, n. 2, p.103-110. Mar-Apr; 2003.
- MOSCICKI, A. B. et al. Updating the natural history of human papillomavirus and anogenital cancers. **Vaccine**, Amsterdam, v. 30, p. 24-33, Nov. 2012. Supp. 5.
- MURPHY, P. M. The molecular biology of leucocyte chemoattractant receptors. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 12, p. 593-633, Apr. 1994.
- MURRAY, P. J. Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3 mediated anti-inflammatory response. **Current Opinion in Pharmacology**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 379-386, Aug. 2006.
- NGUYEN, H. P.; RAMÍREZ-FORT, M. K.; RADY, P. L. The biology of human papillomaviruses. **Current Problems in Dermatology**, Basel, v. 45, p. 19-32, 2014.
- O'BRIEN, P. M. et al. Immunoglobulin genes expressed by B-lymphocytes infiltrating cervical carcinomas show evidence of antigen-driven selection. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, Berlin, v. 50, n. 10, p. 523-532, Dec. 2001.
- O'BRIEN, S. J.; MOORE, J. P. The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 177, p. 99-111, Oct. 2000.
- OHTA, M. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human esophageal squamous cell carcinomas. **International Journal of Cancer**, New York, v. 102, n. 3, p. 220-224, Nov. 2002.
- OLIVEIRA, C. E. C. et al. CC chemokine receptor 5: the interface of host immunity and cancer. **Disease Markers**, Chichester, v. 2014, p. 1-8, Jan. 2014.
- PAAVONEN, J. *Chlamydia trachomatis* infections of the female genital tract: state of the art. **Annals of Medicine**, Helsinki, v. 44, n. 1, p. 18-28, Feb. 2012.
- PAN, Y. et al. Neurotactin, a membrane-anchored chemokine preregulated in brain inflammation. **Nature**, London, v. 387, n. 6633, p. 611-617, June 1997.
- PANZER, U. et al. The chemokine receptor 5 Delta32 mutation is associated with increased renal survival in patients with IgA nephropathy. **Kidney International**, New York, v. 67, n. 1, p. 75-81, Jan. 2005.
- PATEL, S.; CHIPLUNKAR, S. Host immune responses to cervical cancer. **Current Opinion in Obstetrics & Gynecology**, Philadelphia, v. 21, n. 1, p. 54-59, Feb. 2009.

PELUS, L. M. et al. Peripheral blood stem cell mobilization: a role for CXC chemokines. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Boca Raton, v. 43, n. 3, p. 257-275, Sep. 2002.

PETIT, I.; JIN, D.; RAFII, S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 28, n. 7, p. 299-307, July 2007.

PIERCE CAMPBELL, C. M. et al. Consistent condom use reduces the genital human papillomavirus burden among high-risk men: the HPV infection in men study. **The Journal of Infectious Diseases**, Chigago, v. 208, n. 3, p. 373-384, Aug. 2013.

PLUMMER, M.; PETO, J.; FRANCESCHI, S. Time since first sexual intercourse and the risk of cervical cancer. **International Journal of Cancer**, New York, v. 130, n. 11, p. 2638-2644, Aug. 2012.

POIARES, L. A. et al. Validação do método de detecção de Chlamydia trachomatis por reação em cadeia da polimerase em tempo real. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 3, p. 229-232, 2008.

POSER, C. M. The dissemination of multiple sclerosis: a Viking saga? A historical essay. **Annals of Neurology**, Boston, v. 32, p. 231-243, Dec. 1994. Supp. 2.

PROOST, P.; WUYTS, A.; VAN DAMME, J. The role of chemokines in inflammation. **International Journal of Clinical & Laboratory Research**, Berlin, v. 26, n. 4, p. 211-223, 1996.

QIDWAI, T. Chemokine genetic polymorphism in human health and disease. **Immunology Letters**, Amsterdam, n. 176, p.128-138, Aug. 2016. doi: 10.1016/j.imlet.2016.05.018. Epub 2016 Jun 1.

QUEEN, K. J. Epstein-Barr vírus-induced epigenetic alteraations following transiente. **International Journal of Cancer**, New York, v. 132, n. 9, p. 2076-2086, May 2013. doi: 10.1002/ijc.27893.

QUINN, T. C. et al. Diagnosis by AMPLICOR PCR of Chlamydia trachomatis infection in urine samples from women and men attending sexually transmitted disease clinics. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 6, p. 1401-1406, June 1996.

QUINÓNEZ-CALVACHE, E. M. et al. Chlamydia trachomatis frequency in a cohort of HPV-infected Colombian women. **Public Library of Science One**, San Francisco, v. 11, n. 1, p. 1–14, Jan. 2016.

RAMACHANDRAN, B. Functional association of oestrogen receptors with HPV infecyion in cervical carcinogenesis. **Endocrine-Related Cancer**, Woodlands, v. 24, n. 4, p. R99-R108, Apr. 2017. doi: 10.1530/ERC-16-0571.

RAMAKRISHNAN, S.; PARTRICIA, S.; MATHAN, G. Overview of high-risk HPV's 16 and 18 infected cervical cancer: pathogenesis to prevention. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, New York, v. 70, p. 103-110, Mar. 2015.

RAMAN, D.; SOBOLIK-DELMARE, T.; RICHMOND, A. Chemokines in health and disease. **Experimental Cell Research**, New York, v. 317, n. 5, p. 575-89, Mar. 2011. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.01.005. Epub 2011 Jan 9.

SAFAEIAN, M. et al. Chlamydia trachomatis and risk of prevalent and incident cervical premalignancy in a population-based cohort. **Journal of the National Cancer Institute**, Oxford, v. 102, n. 23, p. 1794–1804, Dec. 2010.

SALES, K. J.; KATZ, A. A. Inflammatory pathways in cervical cancer: the UCT contribution. **South African Medical Journal**, Cape Town, v. 102, n. 6, p. 493-496, Mar. 2012.

SAMSON, M. et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. **Nature**, London, v. 332, n. 6593, p. 722-725, Aug. 1996.

SANJOSE, S. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human 11 papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 7, n. 7, p. 453-459, July 2007.

SARAFI, M. N. et al. Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is a structural and functional homologue of human MCP-1. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 185, n. 1, p. 99-109, Jan. 1997.

SASAGAWA, T.; TAKAGI, H.; MAKINODA, S. Immune responses against human 12 papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. **Journal of Infection and Chemotherapy**, Tokyo, v. 18, n. 6, p. 807-815, Dec. 2012.

SAY, L. et al. Global causes of maternal death: a WHO systematic analysis. **The Lancet Global Health**, London, v. 2, n. 6, p. 323-333, June 2014.

SCHEURER, M. E.; TORTOLERO-LUNA, G.; ADLER-STORTHZ, K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology and prevention. **International Journal of Gynecological Cancer**, Cambridge, v. 15, n. 5, p. 727-746, Sep./Oct. 2005.

SCHIFFMAN, M. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **The Lancet**, London, v. 370, n. 9590, p. 890-907, Sep. 2007.

SCHIFFMAN, M.; SOLOMON, D. Clinical practice: cervical-cancer screening with human papillomavirus and cytologic cotesting. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 369, n. 24, p. 2324-2331, Dec. 2013.

SCHULMS, H. et al. Cytomegalovirus infection drives adaptive epigenetic diversification of NK cells with altered signaling and effector function. **Immunity**, Cambridge, v. 42, n. 3, p. 443-56, Mar. 2015. doi: 10.1016/j.immuni.2015.02.008.

SIDOTI, A. et al. Distribution of the mutated delta32 allele of the CCR5 gene in a Sicilian population. **International Journal of Immunogenetics**, Oxford, v. 32, n. 3, p. 193-198, June 2005.

SILVA-CARVALHO, W. H. et al. Frequency of the CCR5 delta 32 allele in Brazilian populations. A systematic literature review. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 43, p.101-107, Sep. 2016. doi: 10.1016/j.meegid.2016.05.024

SINGH, S.; JOHNSON, J.; CHELLAPPAN, S. Small molecule regulators of Rb-E2F pathway as modulators of transcription. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1799, n.10-12, p. 788-794, Oct./Dec. 2010.

SMITH, M. W. et al. Contrasting influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV infection and disease progression. **Science**, New York, v. 277, n. 5328, p. 959-965, Aug. 1997.

SPAGNOLO, P. et al. C-C chemokine receptor 5 gene variants in relation to lung disease in sarcoidosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 172, n. 6, p. 721-728, Sep. 2005.

SPEERS, D. J. Clinical applications of molecular biology for infectious diseases. **The Clinical Biochemist Reviews**, Mount Lawley, v. 27, n. 1, p. 39–51, Feb. 2006.

STEELE, J. C. et al. T-cell responses to human papillomavirus type 16 among women with different grades of cervical neoplasia. **British Journal of Cancer**, London, v. 93, n. 2, p. 248–259, July 2005.

STEPHENS, J. C. et al. Dating the origin of the CCR5-Delta32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes. **American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v. 62, n. 6, p. 1507-1515, June 1998.

STOLER, M. H. Human papillomavirus biology and cervical neoplasia: implications for diagnostic criteria and testing. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, Chicago, v. 127, n. 8, p. 935-939, Aug. 2003.

TAMIM, H. et al. Cervicovaginal coinfections with human papillomavirus and Chlamydia trachomatis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 43, n. 4, p. 277–281, Aug. 2002.

TAN, S. C.; ANKATHIL, R. Genetic susceptibility to cervical cancer: role of common polymorphisms in apoptosis-related genes. **Tumour Biology**, Tokyo, v. 36, n. 9, p. 6633-6644, Sep. 2015.

TAQUETTE, S. R.; VILHENA, M. M.; PAULA, M. C. Doenças sexualmente transmissíveis na adolescência: estudo de fatores de risco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 37, n. 3, p. 210-214, jun. 2004.

TOREZAN, L. A. Linfagranuloma venéreo. In: JÚNIOR, W. B. **Doenças sexualmente transmissíveis**. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 77-83.

TORRE, L. A. et al. Global Cancer Statistics: 2012. **CA: a cancer journal of clinicians**, New York, v. 65, n. 2, p. 87–108, Mar. 2015.

TORRES-POVEDA, K. et al. Role of IL-10 and TGF- $\beta$ 1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia. **World Journal of Clinical Oncology**, Hong Kong, v. 5, n. 4, p. 753-763, Oct. 2014.

TROTTIER, H.; FRANCO, E. L. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. **Vaccine**, Amsterdam, v. 24, p. 1-15, Mar. 2006. Supp. 1.

VAZ, F. A. C.; CECCON, M. E. J.; DINIZ, E. M. A. Infecção por Chlamydia trachomatis no período neonatal: aspectos clínicos e laboratoriais. Experiência de uma década: 1987-1998. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 45, n. 4, p. 303-311, dez. 1999.

WANG, F. S. et al. 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. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, New York, v. 32, n. 2, p. 124-30, Feb. 2003.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2007. **Sexually transmitted infections**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/en/index.html>>. Acesso em: 17 mar. 2011.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections**: 2008. Geneva: WHO Press, 2008.

WILEY, D. J. et al. Smokers at Higher Risk for Undetected Antibody for Oncogenic Human Papillomavirus Type 16 Infection. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Philadelphia, v. 15, n. 5, p. 915-20, May, 2006.

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV 4 infection: unresolved issues. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 7, n. 1, p. 11-22, Jan. 2007.

YAJID, A. I. Potencial role of E4 protein in human papillomavirus screening: a Review. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Bangkok, v. 18, n. 2, p. 315-319, Feb. 2017.

YANG, X. et al. Analysis of the CC chemokine receptor (CCR5) Delta32 polymorphism in Behcet's disease. **European Journal of Immunogenetics**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 11-14, Feb. 2004.

ZHENG, Z. M.; BAKER, C. C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, Tampa, v. 11, p. 2286-2302, Sep. 2006.

ZIMMERMAN, P. A. et al. 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. **Molecular Medicine**, Cambridge, v. 3, n. 1, p. 23-36, Jan. 1997.

ZUNIGA, J. A. et al. Biological relevance of the polymorphism in the CCR5 gene in refractory and non-refractory rheumatoid arthritis in Mexicans. **Clinical and Experimental Rheumatology**, Pisa, v. 21, n. 3, p. 351-354, May/June 2003.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers: a brief historical account. **Virology**, New York, v. 384, n. 2, p. 260-265, Feb. 2009.

## APÊNDICE

## APÊNDICE A

### Questionário Socio-Demográfico

Nº LAB
--------

#### ANEXO 1 - QUESTIONÁRIO SOCIOEPIDEMIOLÓGICO

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Reg. N° \_\_\_\_\_

1. Conhece o HPV???
  - ( ) Nunca ouvi falar
  - ( ) Já ouvi falar mas não sei o que é
  - ( ) Conheço
2. Idade \_\_\_\_\_ anos DN, \_\_\_\_\_
3. Etnia: \_\_\_\_\_  
Branca / parda / negra / asiática / indígena
4. Sua renda mensal (em salário mínimo) é de?
  - ( ) Até 1 Salário      ( ) De 1 à 3 salários
  - ( ) De 3 à 5 salários    ( ) De 5 à 7 salários
  - ( ) De 7 à 10 salários
5. Você fuma?
  - ( ) Não    ( ) Sim    Tempo: \_\_\_\_\_
6. Qual o seu grau de escolaridade?
  - ( ) Fundamental Incompleto
  - ( ) Fundamental Completo
  - ( ) Médio Incompleto    ( ) Médio completo
  - ( ) Superior incompleto    ( ) Sup. completo
7. Estado Civil:
  - ( ) Solteira                      ( ) Casada
  - ( ) Divorciada                  ( ) Viúva
8. Qual sua profissão?  
\_\_\_\_\_
9. Faz o uso de algum método contraceptivo?
  - ( ) Não    ( ) Sim    Qual: \_\_\_\_\_
10. Tipo de Parto:
  - ( ) Normal                      ( ) Cesária
11. Nº de gestações: \_\_\_\_\_
12. Números de Partos:
  - ( ) Nenhum                      ( ) Um
  - ( ) Dois                          ( ) Três
  - ( ) Quatro ou mais
13. Idade da 1ª relação sexual: \_\_\_\_\_ anos
14. Idade da 1ª menstruação: \_\_\_\_\_ anos
15. Número de parceiros sexuais durante a vida:  
\_\_\_\_\_
16. Número de parceiros sexuais nos últimos 6 meses: \_\_\_\_\_.
17. Já realizou outros exames preventivos?
  - ( ) Sim                          ( ) Não
18. Exames de prevenção realizados no passado apresentaram algum tipo de alteração?
  - ( ) Sim                          ( ) Não
  - ( ) Não me lembro
  - Em caso de resposta "Sim" favor descrever a alteração: \_\_\_\_\_
19. Já contraiu alguma infecção ginecológica
  - ( ) Não                          ( ) Sim                          ( ) não sei informar
  - Em caso de resposta "SIM", se possível descrever qual: \_\_\_\_\_
20. Já esteve infectada pelo HPV?
  - ( ) Sim                          ( ) Não                          ( ) Não sei informar
21. Conhece as formas de transmissão ou formas de contrair o vírus?
  - ( ) Não                          ( ) Sim    Qual ou quais: \_\_\_\_\_
22. Existem casos de câncer de colo de útero em sua família?
  - ( ) Sim                          ( ) Não
  - Em caso de resposta "SIM" descrever o grau de parentesco: \_\_\_\_\_
23. PESO \_\_\_\_\_
24. Altura \_\_\_\_\_
- 25 IMC  
Pesquisador: \_\_\_\_\_

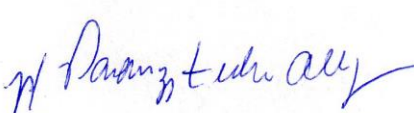
**ANEXOS**

## ANEXO A

Submissão e aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos UEL



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**  
 Universidade Estadual de Londrina  
 Registro CONEP 5231

Parecer CEP/UEL:	133/2012
CAAE:	05505912.0.0000.5231
Processo:	19275/2012
Pesquisador(a):	Karen Brajão de Oliveira
Unidade/Órgão:	CCB – Departamento de Ciências Patológicas
<p>Prezado(a) Senhor(a):</p> <p>O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 5231) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:</p> <p><b>"PREVALÊNCIA E GENOTIPAGEM DE HPV E SUA POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM OS GENES DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS E SEUS RECEPTORES EM NÍVEL DE DNA, RNA E PROTEÍNA: implicações no microambiente tumoral."</b></p>	
<p>Situação do Projeto: <b>Aprovado</b></p> <p>Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá ser encaminhado ao CEP/UEL relatório final da pesquisa, conforme prevê a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares.</p>	
<p align="center">Londrina, 28 de agosto de 2012.</p> <p align="center">   <b>Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli</b>        Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos        Universidade Estadual de Londrina     </p>	

*Prof.ª Dr.ª Paula Mariza Zedu Alliprandini*  
 Vice-Coord. do Comitê de Ética em Pesquisa  
 Envolvendo Seres Humanos  
 Universidade estadual de Londrina

## ANEXO B

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**“Prevalência e genotipagem de HPV e sua possível associação com os genes de citocinas, quimiocinas e seus receptores em nível de DNA, RNA e proteína: Implicações no microambiente tumoral.”**

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar da pesquisa “Prevalência e genotipagem de HPV e sua possível associação com os genes de citocinas, quimiocinas e seus receptores em nível de DNA, RNA e proteína: Implicações no microambiente tumoral.”, realizada no “Laboratório de Genética Molecular e Imunologia, Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina”. O objetivo da pesquisa é avaliar a presença do vírus em mulheres atendidas em programas de prevenção ao câncer cervical do setor público de saúde da região norte do Paraná, por meio de metodologia específica e sensível, visando também à associação de dados demográficos, para análise dos fatores de risco que contribuem para a exposição da população ao vírus, bem como os determinantes de sua manutenção. Adicionalmente objetiva-se compreender o papel do sistema imune no controle e iniciação tumoral, bem como na sua formação, crescimento e progressão, em especial avaliar a interação tumor-hospedeiro em pacientes portadoras do vírus HPV e no desenvolvimento do câncer cervical. A sua participação é muito importante e ela se dará da seguinte forma: doação de 5mL de sangue periférico coletado por punção venosa e doação do swab cervico-vaginal utilizado para confecção das lâminas para o exame preventivo para análises moleculares, bem como responder um questionário sociodemográfico. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo a sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

As amostras biológicas (sangue periférico e secreção cervico-vaginal) serão utilizadas para extração de DNA e RNA para análises moleculares e imunológicas. Estes materiais serão obtidos em pequenas quantidades portanto não haverá sobra de material biológico.

Os benefícios esperados são a detecção precoce do vírus HPV em mulheres atendidas em programas de prevenção ao câncer de colo de útero do setor público de saúde da região norte do Paraná. Informamos que a paciente que se dispôr a participar do projeto não sofrerá desconfortos nem riscos à saúde, não havendo qualquer prejuízo às mesmas. Informamos que a senhora não pagará nem será remunerada por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contactar Karen Brajão de Oliveira, Laboratório de Genética Molecular e Imunologia, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, 3371-4267, karen.brajao@uel.br, ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Koch, nº 60, ou no telefone 33712490. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201 \_\_\_\_.

Pesquisador Responsável \_\_\_\_\_  
 Prof. Dr. Karen Brajão de Oliveira  
 RG: 6.538.742-5

\_\_\_\_\_ (nome por extenso do sujeito de pesquisa), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar voluntariamente da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou Impressão dactiloscópica): \_\_\_\_\_  
 Data: \_\_\_\_\_