

Universidade de Brasília

Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Análise da variabilidade genética, filogenia e expressão gênica
de HPV de alto risco no Distrito Federal**

Tainá Raiol Alencar

Brasília
2009

Universidade de Brasília
Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Análise da variabilidade genética, filogenia e expressão gênica
de HPV de alto risco no Distrito Federal**

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular do
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília,
como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em
Biologia Molecular.

Tainá Raiol Alencar

Orientadora

Dra. Laura Sichero

Prof^a Dra. Cláudia Renata Fernandes Martins (*in memoriam*)

Brasília
2009

Universidade de Brasília
Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Análise da variabilidade genética, filogenia e expressão gênica
de HPV de alto risco no Distrito Federal**

Banca Examinadora

Profª Dra. Paula Rahal – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
(UNESP) - São José do Rio Preto, SP

Profª Dra. Ildinete Silva Pereira– Universidade de Brasília

Profª Dra. Andréa Queiroz Maranhão – Universidade de Brasília

Profª Dra. Cynthia Kyaw – Universidade de Brasília

Profº Dr. Marcelo de Macedo Brígido – Universidade de Brasília (suplente)

Brasília
2009

*“Se enxerguei um pouco mais longe, foi por
estar sobre ombros de gigantes.”*

Isaac Newton

À minha mãe, que me formou como sou e por isso é parte de cada conquista minha.

Ao Júnior, que incansavelmente me estimula a seguir em frente apesar dos obstáculos.

À Claudia Renata, pessoa e profissional batalhadora com quem tanto aprendi.

Às vítimas do HPV, que anonimamente tornaram possível este trabalho.

Agradecimentos

À minha mãe **Sueli Raiol**, aos meus irmãos **Taiguara** e **Tunai**, meu pai **Celmo Alencar**, minha cunhada **Michele Oliveira** e meus sobrinhos **Isabel** e **Samuel** pelo carinho, compreensão, apoio e incentivo constantes.

Ao meu namorado e amigo **Josenilto Júnior**, pela participação e incentivo em todas as minhas realizações.

À **Profª Cláudia Renata Fernandes Martins**, pela amizade, confiança e apoio em todas as etapas da minha formação profissional. Pelo exemplo de vida que foi para todos aqueles que tiveram o privilégio de conviver e trabalhar ao seu lado.

À **Dra. Laura Sichero**, pela amizade, por ter me permitido ser sua orientanda e me apoiado no momento mais difícil do desenvolvimento deste trabalho. Pela contribuição inestimável para o meu aprimoramento técnico e por ter me ajudado a enfrentar a vida em São Paulo.

À **Dra. Luisa Villa**, pelo apoio, exemplo de profissionalismo, compreensão e colaboração indispensável na execução deste trabalho.

À amiga **Regina Amorim**, por ter participado ativamente do desenvolvimento deste trabalho e pelo companheirismo e incentivo. Por ter sido minha parceira na luta para continuar e concluir os últimos projetos de pesquisa iniciados pela Profª Cláudia Martins.

Às amigas **Patrícia Wyant**, **Daniela Cerqueira** e **Natália Milanezi** do grupo de pesquisa em virologia da UnB, por participarem desse estudo, ajudando-me em todas as etapas e tornando-se indispensáveis para a obtenção dos resultados aqui apresentados.

Aos amigos **Claudiner Oliveira**, **Daniella Moraes**, **Eduardo Ramalho**, **Márcio Rojas**, **Verônica Salles**, do grupo de pesquisa em virologia da Universidade de Brasília, pela amizade e colaboração na execução deste trabalho.

Ao grupo de Virologia do Instituto Ludwig de pesquisa sobre o câncer, especialmente a **Aline Bolpetti, Ana Paula Lepique, Carina Manzini, Enrique Boccardo, João Sobrinho, José Carlos Prado, Lara Termini, Laura Cardeal, Maria Antonieta Andreoli, Maria Cecilia Costa, Maria Stella Hering, Neide Ferreira, Tatiana Rabachini e Zanith Cook**, por terem me acolhido e colaborado com a execução deste trabalho.

Ao **Pedro Galante** do Grupo de Bioinformática do Instituto Ludwig pela colaboração indispensável na realização das análises estatísticas deste estudo.

À **Prof^a Mariza Ferreira, Prof^o Marcelo Brígido, Prof^a Sônia Bão, Dr. José Paulo Leite e Geni Nocetti** pela disponibilidade e apoio essenciais ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos técnicos **Evânia, Léa, Isabel e Maria Cristina** do Instituto Ludwig e **César, Marivaldo, Arenildo e Francisca** do laboratório de Fitopatologia da UnB, pela importante e freqüente colaboração.

Aos membros da **Banca Examinadora**, pela participação e auxílio na consolidação deste estudo.

Ao **Marcos, Camila, Luciana e Mário**, pela inestimável colaboração no seqüenciamento automático realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília e na plataforma de sequenciamento da EMBRAPA.

À **Ana e Sandra**, funcionárias da Secretaria do Departamento de Biologia Celular, por me atender sempre com respeito e eficiência.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular**.

Ao **CNPq e Programa Nacional de AIDS/DST** pelo apoio financeiro.

Aos meus **familiares e amigos** pelo constante companheirismo, aprendizado e carinho.

Sumário

RESUMO	10
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE SIGLAS E DE ABREVIATURAS	15
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. ESTRUTURA DA PARTÍCULA VIRAL E ORGANIZAÇÃO DO GENOMA	18
2.2. TAXONOMIA DOS HPV	19
2.3. AS PROTEÍNAS VIRAIS E O CICLO DE INFECÇÃO VIRAL	21
2.3.2. A replicação viral	23
2.3.3. A transformação celular	23
2.3.4. A montagem viral e liberação das partículas	27
2.4. A REGIÃO REGULADORA (LCR)	28
2.4.1. Fatores de transcrição envolvidos na transcrição viral	29
2.5. O CÂNCER DO COLO DO ÚTERO	31
2.5.1. Co-fatores no desenvolvimento do câncer cervical	34
2.5.2. Prevenção	35
2.5.3. Vacinas contra o câncer cervical	35
2.6. EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO POR HPV	36
2.7. ESTUDOS DA VARIABILIDADE GENÉTICA	40
2.8. VARIABILIDADE GENÉTICA E POTENCIAL ONCOGÊNICO	47
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	49
4. MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1. PROCEDÊNCIA DAS AMOSTRAS	51
4.2. AMPLIFICAÇÃO DO DNA VIRAL	51
4.3. CLONAGEM DOS PRODUTOS DE PCR	52
4.3.1. Obtenção dos plasmídios recombinantes	52
4.3.2. Transformação de bactérias <i>E. coli</i>	53
4.4. SEQUENCIAMENTO DE DNA	54
4.5. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE DNA OBTIDAS	54
4.6. PREDIÇÃO DE SÍTIOS DE LIGAÇÃO PARA FATORES DE TRANSCRIÇÃO NA LCR	55
4.7. ANÁLISE FILOGENÉTICA	55
4.8. ANÁLISE DA ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DO PROMOTOR DE E6/E7 DE VARIANTES DE HPV-58	56
4.8.1. Amplificação da LCR	56
4.8.2. Digestão dos produtos de PCR obtidos	57
4.8.3. Ligação dos produtos de PCR ao vetor pGL3-Basic	57
4.8.4. Transformação e obtenção dos plasmídios recombinantes	58
4.8.5. Mutagênese Sítio-Dirigida	58
4.8.6. Sequenciamento dos plasmídios	59
4.8.7. Isolamento do DNA dos vetores recombinantes em larga escala (Maxi-preparação)	60

4.8.8. Purificação do DNA extraído por gradiente de densidade	61
4.8.9. Cultura celular da linhagem C33	62
4.8.10. Transfecção da linhagem celular C33	62
4.8.11. Ensaio de Luciferase e β -Galactosidase	63
4.8.12. Análise estatística	63
5. RESULTADOS	65
5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	65
5.2. PREDIÇÃO DE SÍTIOS DE LIGAÇÃO PARA FATORES DE TRANSCRIÇÃO NA LCR	66
5.3. HPV-31	72
5.4. HPV-33	75
5.5. HPV-35	78
5.6. HPV-52	81
5.7. HPV-58	85
5.8. ANÁLISE DAS DISTÂNCIAS GENÉTICAS INTRATÍPICAS	88
5.9. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO PROMOTOR DE E6/E7 DE VARIANTES DE HPV-58	89
6. DISCUSSÃO	93
6.1. ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE VARIANTES DE HPV-31, -33, -35, -52 E -58.	93
6.2. ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS HPV-31, -33, -35, -52 E -58.	97
6.3. ANÁLISE DA ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DO PROMOTOR DE E6/E7 DE VARIANTES DE HPV-58.	99
7. CONCLUSÕES	104
8. BIBLIOGRAFIA	105

ANEXO I: ARTIGO PUBLICADO - RAIOL ET AL. (2009)	125
--	------------

ANEXO II: SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DE NOVOS VARIANTES DE HPV	133
---	------------

Resumo

Mais de 100 tipos de HPV foram descritos, dos quais 13 são classificados como de alto risco devido à sua associação com o desenvolvimento do câncer cervical. O presente estudo investigou a variabilidade e filogenia dos HPV de alto risco -31, -33, -35, -52 e -58, isolados a partir de amostras do Distrito Federal. Para tanto, a LCR e os genes E6 e L1 foram sequenciados. Diversos variantes foram detectados, incluindo 13 novos variantes de todos os tipos analisados. A análise filogenética dos isolados de HPV-31, -33, -35 e -58 não revelaram agrupamentos étnicos ou geográficos como observados previamente para os HPV-16 e -18. A análise do HPV-35 mostrou uma topologia dicotômica característica de subtipos do HPV. Interessantemente, quatro agrupamentos foram identificados na análise de variantes de HPV-52, dos quais dois puderam ser classificados como ramos Asiático e Europeu. Além disso, nós comparamos a atividade do promotor de E6/E7 de variantes moleculares do HPV-58 detectados no Distrito Federal, uma vez que este é o segundo tipo mais frequentemente detectado em lesões cervicais de alto grau nessa região. Para este propósito, as sequências da LCR do protótipo do HPV-58 e de três variantes foram amplificadas e clonadas à montante do gene repórter luciferase e transfectados transientemente em células C33. Para comparação, também foram analisadas as sequências da LCR dos HPV-18 e -16. O protótipo do HPV-58 e os variantes Bsb-329 e Bsb-327 mostraram atividade transcricional similar ao HPV-16, mas cerca de seis vezes menor que o HPV-18. Interessantemente, o variante de HPV-58 Bsb-295 apresentou uma alta atividade transcricional, mesmo comparável ao HPV-18. Esse variante de HPV-58 é o único isolado em que foi detectada a substituição nucleotídica na posição 7788. Foram construídos mutantes por meio de mutagênese sítio-dirigida com o intuito de analisar o impacto dessa alteração nucleotídica na atividade do promotor viral. A introdução da mutação 7788 no isolado protótipo do HPV-58 levou a uma atividade transcricional similar ao observado para o variante Bsb-295 e o protótipo do HPV-18. Em conjunto, os dados indicam que essa única variação é capaz de aumentar a atividade do promotor viral e poderia levar a uma maior expressão dos oncogenes virais E6 e E7 *in vivo*. Entretanto, estudos adicionais são necessários para identificar os fatores transcricionais celulares envolvidos nessa regulação. O estudo dos variantes de HPV é crucial para entender a sua distribuição geográfica e as diferenças biológicas desses vírus, contribuindo ainda para estudos sobre sua infectividade e patogenicidade.

Abstract

More than 100 HPV types have been described, of which 13 are classified as high-risk due to their association with the development of cervical cancer. The present study explores nucleotide variability and phylogeny of high-risk HPV-31, -33, -35, -52 and -58, isolated from samples from Distrito Federal. For this purpose, the LCR and E6 and L1 genes were sequenced. Several variants of these HPV types were detected, including 13 new variants among all types analyzed. The phylogenetic analysis of HPV-31, -33, -35 and -58 isolates did not reveal any ethnic or geographical clustering, as observed previously for HPV-16 and -18. HPV-35 analysis showed a dichotomic branching characteristic of HPV subtypes. Interestingly, four clusters relative to the analysis of HPV-52 variants were identified, of which two could be classified as Asian and European branches. In addition, we compared E6/E7 promoter activity of HPV-58 molecular variants detected in Distrito Federal, since this is the second most frequent type detected among high-grade cervical lesions in this geographical area. For this purpose, complete LCR sequences from HPV-58 prototype and three more variants were amplified, cloned upstream of the luciferase reporter gene and transiently transfected in C33 cells. For comparison, plasmids containing HPV-18 or -16 prototype LCR sequences were also analyzed. HPV-58 prototype and HPV-58 variants Bsb-329 and Bsb-327 showed promoter activity similar to HPV-16 but about six times lower than HPV-18. Interestingly, HPV-58 variant Bsb-295 presented a high promoter activity, even comparable to HPV-18. This HPV-58 variant is the only isolate in which we detected a substitution in nucleotide position 7788. Mutants were constructed by site-direct mutagenesis in order to analyze the impact of this nucleotide alteration on viral promoter activity. The introduction of the 7788 mutation in the HPV-58 prototype isolate led to a transcription activity similar to that observed for HPV-58 variant Bsb-295 and HPV-18 prototype. Taken together, these data indicate that this single nucleotide variation is capable of enhancing viral promoter activity and could lead to a higher expression of E6 and E7 viral oncogenes *in vivo*. Nevertheless, additional studies are necessary to further identify cellular transcriptional factors involved in this regulation. The study of HPV variants is crucial to understand the intrinsic geographical relatedness and biological differences of these viruses and further contributes to studies concerning their infectivity and pathogenicity.

Lista de Figuras

FIGURA 1. MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE PARTÍCULAS DE PAPILOMAVÍRUS. _____	18
FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENOMA DO HPV. _____	19
FIGURA 3. ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS PAPILOMAVÍRUS BASEADA NA ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO GENE L1. _____	20
FIGURA 4. CICLO DE INFECÇÃO PELO HPV. _____	22
FIGURA 5. ASSOCIAÇÃO DE E7 DE HPV A PROTEÍNA DO RETINOBLASTOMA. _____	25
FIGURA 6. DEGRADAÇÃO DE P53 MEDIADA POR E6 DE HPV. _____	26
FIGURA 7. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LCR DO HPV-16. _____	29
FIGURA 8. HISTÓRIA NATURAL DA INFECÇÃO PELO HPV. _____	32
FIGURA 9. PROGRESSÃO DAS LESÕES DO COLO DO ÚTERO. _____	33
FIGURA 10. DISTRIBUIÇÃO DE TIPOS DE HPV EM MULHERES CITOLÓGICAMENTE NORMAIS POR REGIÃO. FONTE: MODIFICADO DE CLIFFORD <i>ET AL.</i> (2005) _____	37
FIGURA 11. DISTRIBUIÇÃO DE TIPOS DE HPV NO CÂNCER CERVICAL. _____	38
FIGURA 12. ÁRVORE FILOGENÉTICA DO HPV-16. _____	40
FIGURA 13. DIVERSIDADE INTRAGENÓTIPO DO HPV-31. _____	42
FIGURA 14. DIVERSIDADE INTRAGENÓTIPO DO HPV-33. _____	43
FIGURA 15. DIVERSIDADE INTRAGENÓTIPO DO HPV-35. _____	44
FIGURA 16. DIVERSIDADE INTRAGENÓTIPO DO HPV-52. _____	45
FIGURA 17. DIVERSIDADE INTRAGENÓTIPO DO HPV-58. _____	46
FIGURA 18. MAPEAMENTO DE POTENCIAIS SÍTIOS DE LIGAÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO NA LCR DO HPV-31 PROTÓTIPO. _____	67
FIGURA 19. MAPEAMENTO DE POTENCIAIS SÍTIOS DE LIGAÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO NA LCR DO HPV-33 PROTÓTIPO. _____	68
FIGURA 20. MAPEAMENTO DE POTENCIAIS SÍTIOS DE LIGAÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO NA LCR DO HPV-35 PROTÓTIPO. _____	69
FIGURA 21. MAPEAMENTO DE POTENCIAIS SÍTIOS DE LIGAÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO NA LCR DO HPV-52 PROTÓTIPO. _____	70
FIGURA 22. MAPEAMENTO DE POTENCIAIS SÍTIOS DE LIGAÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO NA LCR DO HPV-58 PROTÓTIPO. _____	71
FIGURA 23. VARIABILIDADE GENÉTICA DA LCR E DOS GENES E6 E L1 DE ISOLADOS DE HPV-31. _____	72
FIGURA 24. ANÁLISE FILOGENÉTICA DO HPV-31. _____	74
FIGURA 25. VARIABILIDADE GENÉTICA DA LCR E DOS GENES E6 E L1 DE ISOLADOS DE HPV-33. _____	75
FIGURA 26. ANÁLISE FILOGENÉTICA DE L1 DO HPV-33. _____	77
FIGURA 27. VARIABILIDADE GENÉTICA DA LCR E DOS GENES E6 E L1 DE ISOLADOS DE HPV-35. _____	78
FIGURA 28. ANÁLISE FILOGENÉTICA DO HPV-35. _____	80
FIGURA 29. VARIABILIDADE GENÉTICA DA LCR E DOS GENES E6 E L1 DE ISOLADOS DE HPV-52. _____	82
FIGURA 30. ANÁLISE FILOGENÉTICA DO HPV-52. _____	84
FIGURA 31. VARIABILIDADE GENÉTICA DA LCR E DOS GENES E6 E L1 DE ISOLADOS DE HPV-58. _____	85
FIGURA 32. ANÁLISE FILOGENÉTICA DO HPV-58. _____	87

FIGURA 33. VARIABILIDADE GENÉTICA DA LCR DOS ISOLADOS DE HPV-58. _____	90
FIGURA 34. RAZÕES RELATIVAS DE UNIDADES DE LUMINESCÊNCIA (RLU) DETECTADAS ENTRE OS ISOLADOS DE HPV-58, -16 E -18. _____	90
FIGURA 35. UNIDADES RELATIVAS DE LUMINESCÊNCIA (RLU) DETECTADAS ENTRE OS ISOLADOS DE HPV-58, -16 E -18. _____	91
FIGURA 36. ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DE UNIDADES RELATIVAS DE LUCIFERASE (RLU). _____	92

Lista de Tabelas

TABELA 1. IMPLICAÇÕES FUNCIONAIS DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO HPV. _____	48
TABELA 2. INICIADORES ESPECÍFICOS DESENHADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO LCR DO HPV-33 E DO GENE E6 DOS HPV-33 E -58. _____	52
TABELA 3. INICIADORES UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DA LCR DOS VARIANTES DE HPV-58. _____	56
TABELA 4. DADOS DA LESÃO CITOPATOLÓGICA, IDADE DAS PACIENTES, CO-INFECCÃO COM DIFERENTES TIPOS DE HPV E DETECÇÃO DE HIV DE AMOSTRAS DE HPV-31, -33, -35, -52 E -58 COLETADAS NO DISTRITO FEDERAL. _____	65
TABELA 5. COMPARAÇÃO DO NÚMERO DE VARIAÇÕES NUCLEOTÍDICAS RELATIVAS AO TOTAL DE NUCLEOTÍDEOS SEQUENCIADOS E MÁXIMAS DISTÂNCIAS GENÉTICAS INTRATÍPICAS ENTRE OS ISOLADOS DE HPV-31, -33, -35, -52 E -58 DETECTADOS NO DISTRITO FEDERAL. _____	89

Lista de Siglas e de Abreviaturas

AA - Variante Asiático–Americano

Af - Variante Africano

AP-1 - Proteína Ativadora 1 (*Activator Protein-1*)

As - Variante Asiático

ATCC – *American Type Culture Collection*

BLAST - Ferramenta básica de alinhamento local (*Basic Local Alignment Search Tool*)

C/EBP - Proteína de ligação à seqüência CCAAT (*CCAAT enhancer binding protein*);

CDK - quinase dependente de ciclina (*Cyclin Dependent Kinase*)

CENARGEN - Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia

cMyc - *Cellular myelocytomatosis oncogene*

DF - Distrito Federal

DNA - ácido desoxirribonucléico

E - Variante Europeu

E6AP – Proteína de associação a E6 (*E6 Associated Protein*);

EGF-R - Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (*epidermal growth factor receptor*)

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

G1- Fase de Gap 1 do ciclo celular

GenBank – Banco de dados de seqüências do Centro de Informação sobre Biotecnologia Nacional (NCBI - *National Center for Biotechnology Information*)

GRE - Elemento de resposta a glicocorticóide (*Glucocorticoid Response Element*);

HPV - Papilomavírus humano (*Human Papillomavirus*)

HDAC - Histona Deacetilase

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

HLA - Antígeno Leucocitário Humano

HSIL - Lesão escamosa epitelial de alto grau (*High-grade squamous intraepithelial lesion*)

hTERT - Subunidade catalítica da enzima telomerase (*human Telomerase Reverse Transcriptase*)

IARC - Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (*International Agency for Research on Cancer*)

INCA - Instituto Nacional do Câncer

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

LSIL - Lesão escamosa epitelial de baixo grau (*Low-grade squamous intraepithelial lesion*);

NF1 - Fator nuclear 1 (*Nuclear Factor 1*)

NIC - Neoplasia Intra-Epitelial Cervical

Oct-1 - Fator de ligação a octâmero (*Octamer binding factor -1*)

ORF - Região Aberta de Leitura (*Open Reading Frame*)

pb - pares de bases

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)

pRb - Proteína do Retinoblastoma (*Retinoblastoma protein*)

PRE - Elemento de Resposta à Progesterona (*Progesterone Response Element*)

RFLP - Polimorfismo do Tamanho de Fragmentos de Restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

RLU - Unidades Relativas de Luminescência (*Relative Light Unit*)

RR - Risco Relativo

S - Fase de síntese do ciclo celular

Sp1 - Fator promotor seletivo -1 (*Selective promoter factor 1*)

TBP - Proteína de Ligação a TATA (*TATA binding protein*)

TEF-1 - Fator de Aumento Transcricional (*Transcriptional enhancer factor-1*)

VLP - Partícula Semelhante a Vírus (*Virus Like Particle*)

WHO - World Health Organization

YY1 - Fator *yin-yang*

1. Introdução

O câncer de colo do útero é a segunda causa de morte na população feminina no mundo (IARC, 2007) e, também, no Brasil (INCA, 2008). Esta doença está associada à infecção pelos papilomavírus humanos (*Human papillomavirus* - HPV), detectados em mais de 99% dos casos de câncer de colo do útero. A infecção por HPV é considerada um passo intermediário necessário para o desenvolvimento do câncer cervical (Franco *et al.*, 2003; Walboomers *et al.*, 1999). A infecção por HPV está entre as doenças de transmissão sexual de etiologia viral mais comum. Estima-se que 75% da população em idade reprodutiva esteja infectada com HPV genital e que a maioria das mulheres sexualmente ativas irá adquirir infecção por HPV ao longo da vida (Ho *et al.*, 1998).

Oitenta por cento dos casos de câncer de colo do útero ocorrem em países em desenvolvimento e, em algumas regiões, esta é a neoplasia mais comum entre as mulheres (IARC, 2007; INCA, 2008). No Brasil, estimou-se em cerca de 19.000 o número de novos casos de câncer de colo do útero no ano de 2008. Excluindo-se os tumores de pele não melanoma, o câncer de colo do útero foi o mais incidente na região Norte, com 22 casos para cada 100.000 mulheres (22/100.000), o segundo mais incidente nas regiões Sul (24/100.000), Centro-Oeste (19/100.000) e Nordeste (18/100.000), e o quarto mais incidente na região Sudeste (18/100.000) (INCA, 2008). Na região Centro-Oeste, a estimativa foi de 1.350 novos casos para 2008, sendo 220 no Distrito Federal (INCA, 2008). Esses números podem estar subestimados, visto que, tanto o câncer de colo do útero, quanto a infecção por HPV, não são doenças de notificação compulsória (Ministério da Saúde, 2003).

Devido à grande morbidade e mortalidade causadas por esses vírus, grupos de pesquisa médica, epidemiológica e básica tem dado grande atenção aos HPV, a fim de entender melhor sua patogenicidade e infectividade, e, assim, estabelecer terapias mais adequadas às infecções e lesões causadas por esses vírus.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Estrutura da partícula viral e organização do genoma

Os papilomavírus (PV) são um grupo diverso de vírus encontrados em mais de 20 espécies de mamíferos, bem como em aves e répteis. Devido à grande importância médica, os papilomavírus humanos (HPV) têm sido os mais estudados. Os HPV são vírus não envelopados de simetria icosaédrica e medem aproximadamente 55nm de diâmetro (Fauquet *et al.*, 2005) (Figura 1).

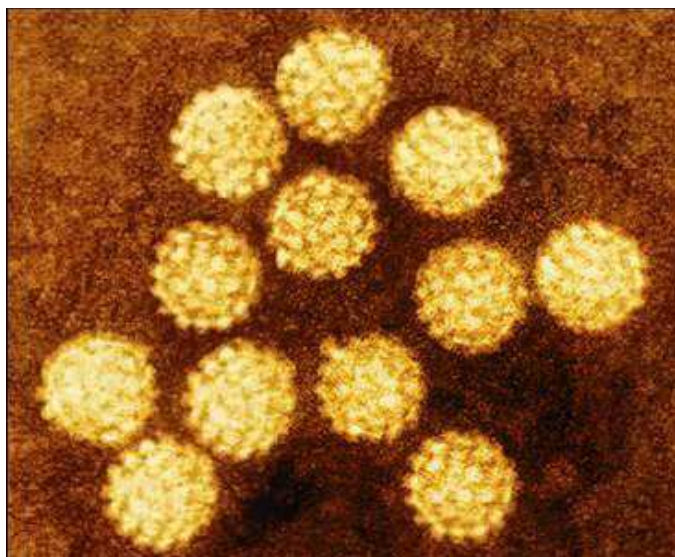


Figura 1. Micrografia eletrônica de partículas de papilomavírus. Fonte: Stannard (1995).

O genoma dos HPV é constituído de um DNA dupla fita circular de aproximadamente 8.000 pares de base (pb) associado às histonas celulares H2a, H2b, H3 e H4, formando um complexo semelhante à cromatina. O genoma viral possui 8 fases abertas de leitura (*Open Reading Frames - ORF*) e uma região não codificadora, LCR (*Long Control Region*), que contém elementos de regulação da replicação viral e expressão gênica (zur Hausen, 1996; Bernard, 2002).

Estruturalmente, o genoma viral pode ser dividido em três partes: uma região precoce (*E-early*) com cerca de 4kb, a qual codifica as proteínas não estruturais E1, E2, E4, E5, E6 e E7; uma região tardia (*L-late*) com, aproximadamente 3kb, que codifica as duas proteínas do capsídeo L1 e L2; e a região reguladora, LCR, de cerca de 1kb, que engloba elementos regulatórios e sítios de ligação para fatores de transcrição celulares e viral (zur Hausen, 2002). A representação esquemática do genoma do HPV está mostrada na Figura 2.

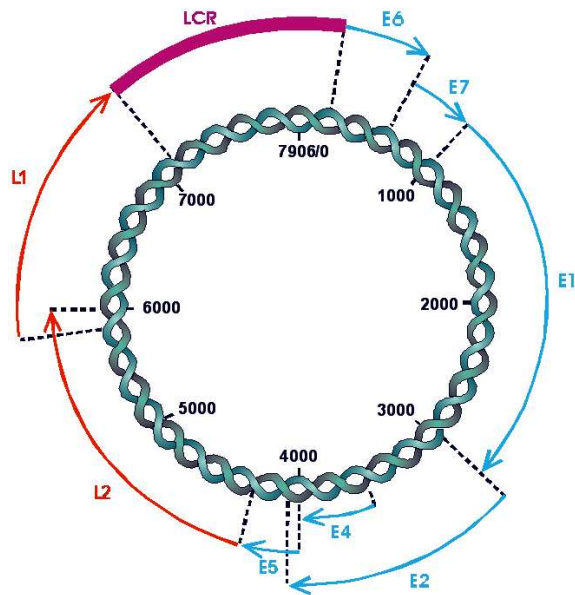


Figura 2. Representação esquemática do genoma do HPV. Observam-se na figura, em azul, a região precoce, responsável pela síntese das proteínas não estruturais E1, E2, E4, E5, E6 e E7, em vermelho, a região tardia, que codifica as proteínas estruturais L1 e L2, e, em lilás, a região reguladora ou LCR (*long control region*). As setas, ao final de cada gene, indicam a direção única em que ocorre a transcrição dos genes do HPV. Na parte interna da figura estão indicadas as posições nucleotídicas no genoma viral a cada 1000pb. Fonte: Modificado de Burk *et al.* (1999).

2.2. Taxonomia dos HPV

Os HPV pertencem à família *Papillomaviridae* e aos gêneros *Alphapapillomavirus*, HPV que preferencialmente infectam a mucosa oral ou anogenital em humanos e primatas; *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Nupapillomavirus* e *Mupapillomavirus*, HPV que infectam preferencialmente a pele de humanos (Fauquet *et al.*, 2005) (Figura 3).

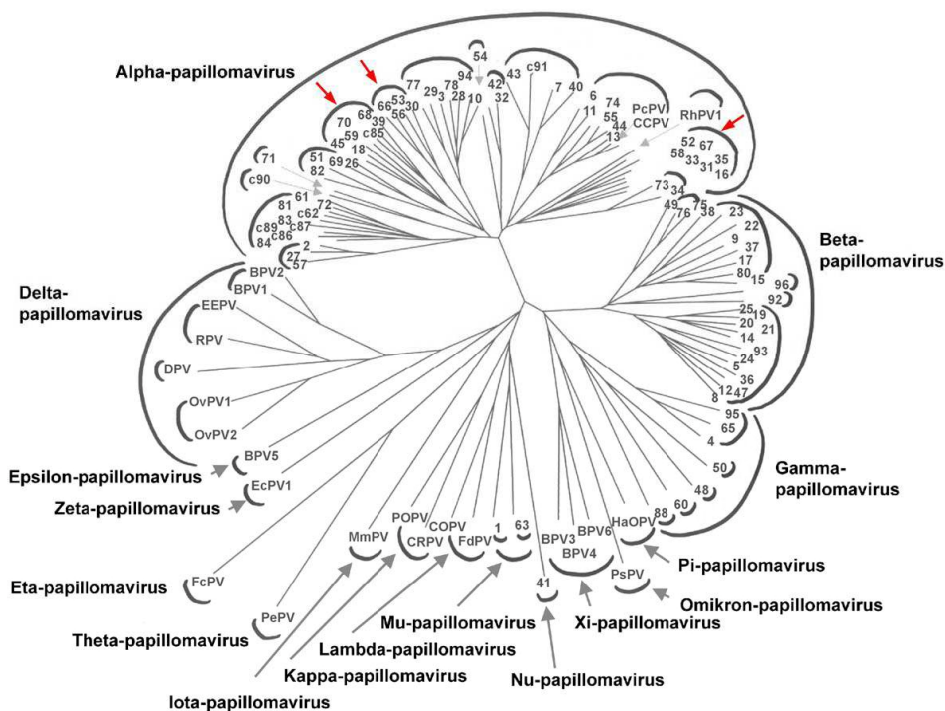


Figura 3. Árvore filogenética dos papilomavírus baseada na análise da sequência do gene L1. Os números nas pontas dos ramos identificam os tipos de HPV, c seguido de um número indica um novo candidato a tipo de HPV. Todas as outras abreviações se referem a tipos de papilomavírus que infectam animais. Os semicírculos externos identificam os gêneros e os semicírculos internos, as espécies. Setas vermelhas indicam as espécies contendo HPV de alto risco oncogênico. Fonte: Modificado de de Villiers *et al.* (2004).

A classificação dos HPV baseia-se na diversidade genômica da sequência completa do gene L1, que é muito conservado entre os diferentes tipos virais. A família *Papillomaviridae* engloba 16 gêneros que apresentam entre si uma diferença maior que 40% na sequência nucleotídica do gene L1, enquanto as espécies apresentam diferença entre 30% e 40%. As espécies são denominadas pelo tipo de HPV mais estudado entre os tipos que as compõem. Além da classificação em família, gênero e espécie, os papilomavírus são classificados em tipos, subtipos e variantes. Um tipo de HPV difere de outro quando apresenta ao menos 10% de divergência na sequência do gene L1. A classificação em subtipo ocorre quando uma sequência do gene L1 diverge entre 2% a 10% daquela do tipo mais próximo. Os variantes de tipos de HPV diferem em menos de 2% na sequência de nucleotídeos de L1, e em até 5% na LCR (Ho *et al.*, 1993; de Villiers *et al.*, 2004; IARC, 2007).

Até o momento, foram descritos mais de 100 tipos de HPV. Os tipos são nomeados pela sigla HPV seguida de um número que é dado sequencialmente, à medida que diferentes tipos são caracterizados (de Villiers *et al.*, 2004). Os tipos de HPV são

classificados ainda em cutâneos e mucosotrópicos, dependendo do tropismo pelo tecido infectado. Os tipos cutâneos são aqueles que infectam a pele e os mucosotrópicos são os que infectam as mucosas urogenitais, anais e oro-respiratórias. Os HPV mucosotrópicos podem também ser divididos em baixo ou alto risco oncogênico, de acordo com o potencial de progressão do tecido infectado para neoplasias. Os HPV de alto risco oncogênico estão mais frequentemente associados ao risco de desenvolvimento de câncer cervical, sendo considerados os principais causadores de neoplasias cervicais em todo o mundo. Infecções pelos tipos oncogênicos de HPV representam 50% a 75% de todas as infecções por estes vírus (Muñoz *et al.*, 2003, Clifford *et al.*, 2005). Os 13 tipos de HPV considerados de alto risco pertencem ao gênero *Alphapapillomavirus* e às espécies *Human Papillomavirus 16*, *Human Papillomavirus 18* e *Human Papillomavirus 53*, separadas em três ramos filogenéticos distintos (de Villiers *et al.*, 2004; Fauquet *et al.*, 2005) (Figura 3).

2.3. As proteínas virais e o ciclo de infecção viral

O ciclo de infecção dos papilomavírus é dependente da diferenciação dos queratinócitos. A fim de que os HPV do gênero *Alphapapillomavirus*, que infectam mucosas, atinjam as células da camada basal do epitélio, parece ser necessária uma quebra do epitélio estratificado, como microlesões ou abrasão, que ocorrem na pele ou mucosa por contato direto, como resultado, por exemplo, de atividade sexual ou durante o parto normal (Doorbar, 2005) (Figura 4).

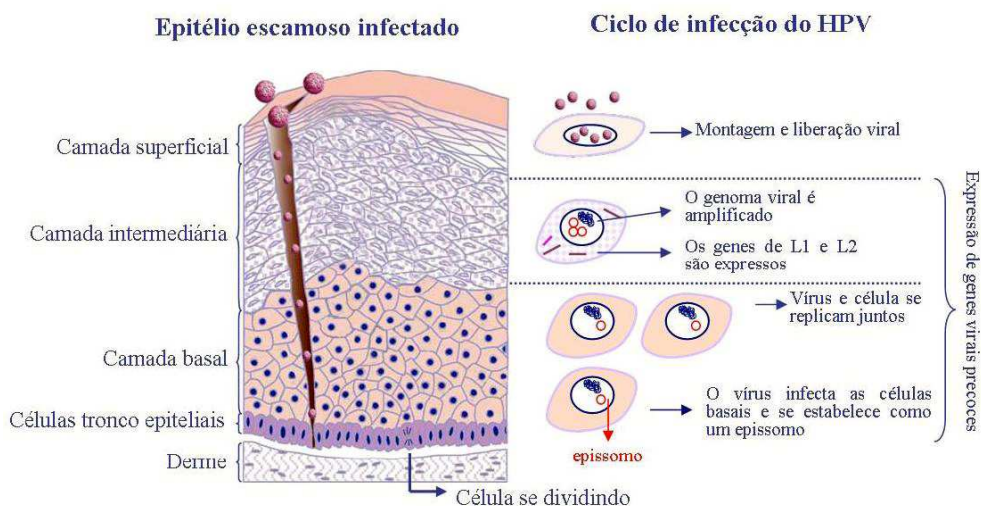


Figura 4. Ciclo de infecção pelo HPV. Micro-traumas no epitélio expõem as células basais e facilitam a infecção pelo HPV. Após a entrada na célula, o vírus é desnudado e o genoma viral alocado no núcleo celular. O DNA viral permanece como um episossomo e se divide simultaneamente, mas de forma independente, do genoma da célula hospedeira. Após a divisão, as células migram da camada basal passando pela intermediária e atingindo a superficial. Durante esse processo as células infectadas continuam se multiplicando, o que resulta na amplificação do genoma viral em milhares de cópias por célula. Na camada intermediária do epitélio, as proteínas L1 e L2 que compõe o capsídeo são expressas. A montagem dos vírions e o empacotamento do DNA celular ocorrem na camada superficial, sendo as partículas infecciosas liberadas com a esfoliação das células. Fonte: Adaptado de Doorbar (2005) e Merk (2006).

2.3.1. A entrada do vírus na célula

A natureza do receptor responsável pela entrada do vírus na célula ainda é controversa. Evander *et al.* (1997) sugeriram que a entrada da partícula do papilomavírus na célula é mediada pela ligação à integrina $\alpha 6$, enquanto estudos mais recentes sugerem que proteoglicanas heparan-sulfato são os receptores celulares responsáveis pelo reconhecimento e ligação inicial dos vírions às células, pela interação com a região C-terminal da proteína do capsídeo L1 (Joyce *et al.*, 1999; Shafti-Keramat *et al.*, 2003). Porém, Patterson *et al.* (2005) demonstraram que a infecção de queratinócitos pelo HPV-31 não é dependente de heparan-sulfato, sugerindo haver diferença de receptores celulares na ligação e internalização dos diferentes tipos do HPV. Foi observado para os HPV-16 e -58, que a internalização parece ocorrer por endocitose mediada por clatrina, enquanto que o HPV-31 parece ser internalizado por meio da membrana caveolar (Bousarghin *et al.*, 2003).

Após a internalização, as partículas do HPV são desmontadas em endossomos tardios e/ou em lisossomos, seguida da transferência do DNA viral para o núcleo da célula. Essa transferência parece ser facilitada pela proteína do capsídeo viral L2 (Day *et al.*, 2004). Inicialmente, o genoma permanece nas células da camada basal, como um

epissomo estável, sem integração ao genoma da célula hospedeira, onde ocorre síntese das proteínas precoces E1, E2, E4 e E5 (Doorbar, 2006) (Figura 4).

2.3.2. A replicação viral

E1 e E2 são as principais proteínas virais envolvidas na replicação viral. A proteína precoce E1 tem importante papel na manutenção do DNA viral na forma episomal (Wilson *et al.*, 2002). Durante a infecção, E1 é expressa em níveis muito baixos e requer a presença de E2 para se ligar de forma eficiente ao seu sítio de ligação na LCR. A formação de um complexo entre E1 e E2 na origem de replicação induz uma modificação no DNA viral, facilitando o recrutamento de moléculas adicionais de E1 e o eventual desligamento de E2 (Sarafi e McBride, 1995). Além disso, E2 facilita a correta segregação do genoma viral durante a divisão celular (McPhillips *et al.*, 2005). Foi demonstrado que o genoma viral se replica junto com o DNA da célula durante a fase S do ciclo celular, e os genomas replicados são particionados igualmente durante a divisão celular (You *et al.*, 2004)

Embora E1 e E2 sejam primordiais para a amplificação do genoma, as proteínas virais E4 e E5 também contribuem nesse processo (Genther *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2005). Genomas dos HPV-16 e -31 mutantes em E5 exibem níveis mais baixos de amplificação do genoma em relação ao tipo selvagem, e isso pode ser devido à habilidade de E5 em modular a sinalização celular estar comprometida nesses mutantes. E5 é uma proteína transmembrana que reside predominantemente no retículo endoplasmático, mas que pode se associar com a ATPase de prótons vacuolar inibindo diretamente a bomba de prótons. O mecanismo de ação de E5 reduz a acidificação dos endossomos, inibindo a degradação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGF-R) internalizado e assim, mantendo um ambiente favorável para a replicação viral nas camadas superiores do epitélio (Straight *et al.*, 1993; Disbrow *et al.*, 2005).

Em contraste, o papel de E4 na amplificação do genoma ainda não foi completamente estabelecido. E4 se acumula na célula no momento da amplificação do genoma viral e quantidades reduzidas dessa proteína parecem prejudicar o processo de replicação viral (Nakahara *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2005).

2.3.3. A transformação celular

Em lesões cervicais causadas por HPV, o aumento da proliferação das células epiteliais suprabasais é atribuído principalmente à expressão dos oncogenes virais E6 e

E7. Durante a infecção, a atividade dessas proteínas estimula a divisão de um pequeno número de células infectadas, aumentando o número de células que, subsequentemente, irão produzir partículas infecciosas. A habilidade de E6 e E7 em conduzir as células até a fase S é também necessária, juntamente com E1 e E2, para a replicação de episômos virais acima da camada basal (Doorbar, 2006).

As células mais distais do epitélio estratificado tem o ciclo celular interrompido e passam ao processo de diferenciação terminal, produzindo uma barreira de proteção de queratina, encontrada nas camadas superficiais da mucosa. Em queratinócitos infectados por HPV de alto risco oncogênico, entretanto, a parada da progressão do ciclo celular é perdida, o que provoca inibição da diferenciação terminal (Sherman *et al.*, 1997).

Em lesões cervicais de alto grau e nos tumores, o DNA do HPV está geralmente integrado ao genoma do hospedeiro. Esse evento promove a perda dos genes E1 e o rompimento do gene E2 (Baker *et al.*, 1987). No entanto, os genes E6 e E7 são preservados e expressos em linhagens celulares de câncer cervical e neoplasias associadas ao HPV. Isso resulta no término da amplificação do DNA viral e na ativação constante do promotor precoce do HPV (Stoler *et al.*, 1992; zur Hausen, 2002).

O mecanismo pelo qual os papilomavírus estimulam a progressão do ciclo celular é atribuído principalmente às proteínas virais E6 e E7. A proteína E5 parece também ter um papel na tumorigênese, uma vez que foi demonstrado que E5 induz fibroblastos a formar colônias em *soft agar* (Straight *et al.*, 1993), aumenta a eficiência da imortalização de queratinócitos por E6 e E7 (Stöppler *et al.*, 1996b), além de prejudicar significativamente a comunicação célula-célula (Oelze *et al.*, 1995). Adicionalmente, foi relatado que E5 inibe a expressão do supressor de tumor p21, o que sugere que pode existir uma cooperação com E6 e E7 no processo de transformação de queratinócitos (Tsao *et al.*, 1996). É também possível que E5 interfira com a habilidade do sistema imune em eliminar as células infectadas por prejudicar a sinalização celular (Kabsch e Alonso, 2002).

A associação de E7 a membros da família de proteínas do retinoblastoma, incluindo pRb, p107 e p130, explica como E7 exerce seus efeitos estimulatórios na proliferação celular (Münger e Howley, 2002). A proteína do retinoblastoma (pRb) é uma reguladora negativa do ciclo celular na transição da fase G1 para S, e seu estado de fosforilação é regulado durante o ciclo celular. No estado hipofosforilado, pRb se liga ao fator transcricional E2F durante a fase G1. Devido à fosforilação de pRb por

quinases dependentes de ciclinas (CDK), em resposta a sinais de proliferação celular, o complexo pRb/E2F se dissocia e E2F é liberado e ativa transcricionalmente genes envolvidos na progressão do ciclo celular. A associação de E7 à pRb impede a ligação desta a E2F, promovendo então a progressão contínua para a fase S do ciclo celular (Dyson *et al.*, 1989; Cheng *et al.*, 1995) (Figura 5).

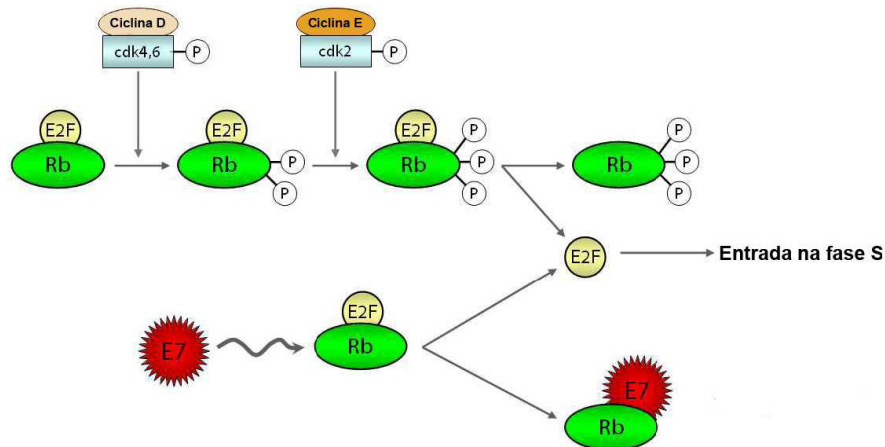


Figura 5. Associação de E7 de HPV a proteína do retinoblastoma. A fosforilação sequencial da proteína do retinoblastoma (Rb) por complexos ciclina/CDK inibem sua atividade repressora do ciclo celular. A proteína E7 de HPV se liga a Rb em sua forma hipofosforilada. Essa ligação desfaz o complexo entre Rb e o fator de transcrição celular E2F, resultando na liberação deste fator, o que permite que a célula entre na fase S do ciclo celular. Fonte: Modificado de Jo e Kim (2005).

Além da ligação a membros da família Rb, E7 influencia a transcrição induzida por E2F por outros meios. Foi demonstrado que E7 interage com histona deacetilases (HDAC), que atuam como repressores transcricionais. A ligação de E7 a HDAC aumenta especificamente os níveis de transcrição mediada por E2F em células em diferenciação, assim levando as células à fase S (Longworth e Laimins, 2004).

A função da proteína viral E6 complementa a de E7 e, nos HPV de alto risco, as duas proteínas são expressas simultaneamente a partir de um único mRNA bicistrônico (Tang *et al.*, 2006). O processo de apoptose, devido à liberação de E2F mediada por E7 nas células das camadas suprabasais, é impedido pela atividade da proteína E6 dos HPV de alto risco, que se liga à proteína supressora de tumor p53. Isso ocorre através da proteína de associação a E6 (E6AP), um polipeptídeo celular que tem atividade de ubiquitina ligase, formando assim um complexo trimérico. Esse complexo atua marcando especificamente p53 para a degradação, por meio da ubiquitinação (Werness *et al.*, 1990; Huibregtse *et al.*, 1991; Scheffner *et al.*, 1993) (Figura 6).

Embora as proteínas E6 de todos os HPV genitais tenham provavelmente alguma propriedade de ligação à p53, somente as dos tipos de alto risco se ligam com alta afinidade e provocam sua degradação (Lechner e Laimins 1994; Hiller *et al.*, 2006). O papel anti-apoptótico de E6 é chave para o desenvolvimento de cânceres cervicais, pois compromete a efetividade de reparo celular do DNA, permitindo o acúmulo de mutações secundárias.

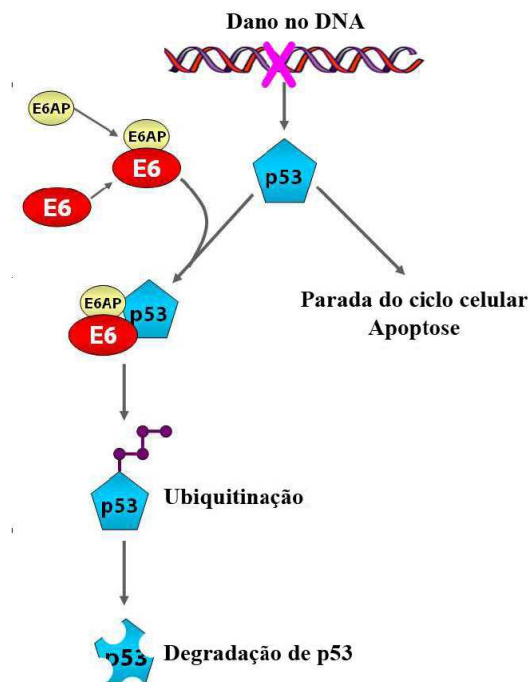


Figura 6. Degradação de p53 mediada por E6 de HPV. Danos ao DNA induzem a ativação de p53 levando tanto à parada do ciclo celular quanto à apoptose. E6 se liga a E6-AP e o complexo formado se liga a p53. E6-AP ubiquitina p53, que é rapidamente degradada pelo proteassomo. Fonte: Modificado de Jo e Kim (2005).

A proteína E6 de HPV de alto risco se liga a várias outras proteínas celulares (zur Hausen, 2002). Foi demonstrado que E6 interage e leva à degradação de proteínas contendo domínios PDZ que estão envolvidas na sinalização celular e adesão célula-célula. A associação de E6 com proteínas PDZ parece ter um papel importante no ciclo viral, podendo ainda contribuir para carcinogênese, uma vez que algumas delas têm funções de supressoras de tumor (Lee *et al.*, 2000; Massimi *et al.*, 2004). Outra importante função da proteína E6 dos HPV de alto risco é a ativação da telomerase em células infectadas (Klingelutz *et al.*, 1996). Nas células normais, os vários ciclos de replicação do DNA resultam no encurtamento dos telômeros, eventualmente levando à instabilidade cromossomal e senescência celular. Foi demonstrado que a proteína E6

dos HPV de alto risco ativam a subunidade catalítica da enzima telomerase (*human Telomerase Reverse Transcriptase* - hTERT) aumentando, assim, o comprimento dos telômeros nas células epiteliais. Além de estender a vida das células epiteliais para produção da progênie viral, esse efeito também influencia a carcinogênese induzida por HPV pois a super-expressão de hTERT aliada à expressão de E7 é suficiente para imortalizar queratinócitos humanos primários (Kiyono *et al.*, 1998; Veldman *et al.*, 2001).

2.3.4. A montagem viral e liberação das partículas

O estágio final do ciclo replicativo dos HPV envolve o empacotamento dos genomas em partículas infecciosas. Nas camadas suprabasais do epitélio, as proteínas do capsídeo (L1 e L2) se acumulam (Figura 4), com a expressão de L2 precedendo a expressão de L1 (Florin *et al.*, 2002). Após a síntese no citoplasma, L1 e L2 são direcionadas para o núcleo, onde ocorre a montagem das novas partículas virais (Day *et al.*, 1998; Buck *et al.*, 2004).

Além das proteínas que compõem o capsídeo viral, foi sugerido que E2 pode também ser necessária para a encapsidação do genoma do HPV por aumentar a eficiência deste evento durante a infecção natural (Zhao *et al.*, 2000). A proteína L1 é o principal elemento estrutural do capsídeo viral, o qual é formado por 360 cópias de L1 organizadas em 72 capsômeros arranjados na superfície do icosaedro, sendo cada capsômero composto por 5 moléculas de L1. Estudos mostram que existem apenas 12 cópias da proteína L2 por vírion (Trus *et al.*, 1997; Modis *et al.*, 2002). Embora as partículas de HPV tenham a capacidade de auto-montagem na ausência de L2, a presença desta proteína contribui para o empacotamento eficiente e aumenta a infectividade do vírus. Em HPV-31 foi demonstrado que a perda de L2 resulta em uma redução de 10 vezes na eficiência do empacotamento, além de uma redução de 100 vezes na infectividade viral, quando comparado ao HPV-31 selvagem (Holmgren *et al.*, 2005).

A liberação eficiente das partículas virais parece ser facilitada pela proteína E4 que se associa a filamentos intermediários do citoesqueleto quando expressa *in vitro*. Isso pode levar a um aumento da fragilidade da célula infectada, facilitando a lise celular e, portanto, a liberação das partículas virais (Doorbar *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2004). Os vírions são liberados durante a descamação celular, na superfície da lesão (Turek e Smith, 1996).

2.4. A região reguladora (LCR)

A LCR é um segmento não codificador de aproximadamente 850pb que se localiza entre o final do gene L1 e o início do gene E6 (Figura 7). Esta região controla a replicação viral e apresenta vários sítios de ligação para fatores transcricionais celulares e viral (O'Connor *et al.*, 1995). A LCR pode ser dividida em 3 segmentos: a região 5', o segmento central e a região 3', que está localizada diretamente a montante dos genes E6 e E7. Na região 3' da LCR localiza-se o promotor responsável pela transcrição dos genes precoces, incluindo os oncogenes E6 e E7 (O'Connor *et al.*, 1995). O segmento central da LCR engloba o *enhancer* epitélio-específico que caracteriza-se por ser mais ativo em células epiteliais que em outros tipos celulares. Sítios para vários fatores de transcrição celulares, incluindo AP-1 (Chan *et al.*, 1990; Offord *et al.*, 1990), NF-1 (Apt *et al.*, 1993), Oct-1 (Hoppe-Seyler *et al.*, 1991; O'Connor e Bernard, 1995), TEF-1 (Ishiji *et al.*, 1992) e YY1 (May *et al.*, 1994; O'Connor *et al.*, 1996), e para hormônios esteróides (Chan *et al.*, 1989) foram identificados nessa região (Figura 7). A especificidade do *enhancer* e, assim, do tropismo do HPV, parece ser definida por uma combinação de sítios de ligação a fatores de transcrição no *enhancer*, além de diferenças quantitativas e qualitativas desses fatores transcricionais ou co-fatores celulares entre as células epiteliais e as de outros tecidos (Cripe *et al.*, 1987; Gloss *et al.*, 1987). A região 5' da LCR contém sinais para terminação e poliadenilação de transcritos virais tardios, além de um sítio de ligação à matriz nuclear (Tan *et al.*, 1998).

A composição dos sítios de ligação para fatores de transcrição na LCR de HPV, até o momento, tem sido investigada apenas para os tipos -16 e -18. Nesses tipos, o promotor de E6/E7 contém quatro elementos conservados: os sítios 3 e 4 de ligação a E2, um sítio de ligação para o fator de transcrição promotor-seletivo 1 (*Selective promoter factor 1*- Sp1) sobreposto ao sítio 3 de E2, além do sítio 4 de ligação a E2 sobreposto ao "TATA-box" (Figura 7). A ocupação alternada desses sítios pelo respectivo fator de reconhecimento promove diferentes níveis de atividade do promotor de E6/E7 (Gloss *et al.*, 1990; Tan *et al.*, 1992).

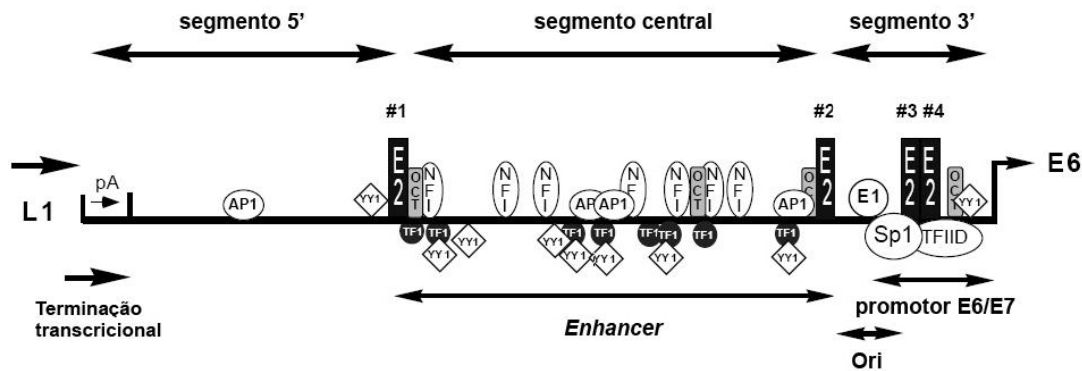


Figura 7. Representação esquemática da LCR do HPV-16. Quatro sítios de ligação a E2 estão presentes na LCR, sendo que dois deles dividem a LCR em segmentos funcionais distintos, os quais são denominados segmento 5', central e 3'. O segmento 5' contém o sinal de terminação, denotado "pA", o segmento central é o enhancer epitélio específico, o qual contém a maioria dos sítios de ligação para fatores de transcrição, e o segmento 3' contém a origem de replicação e o promotor E6/E7. Fonte: Modificado de O'Connor *et al.* (1995).

2.4.1. Fatores de transcrição envolvidos na transcrição viral

E2: Em adição ao seu papel na replicação e segregação do genoma, E2 atua como fator de transcrição regulando o promotor viral precoce e controlando a expressão dos oncogenes virais E6 e E7. A proteína E2 existe como um homodímero e se liga especificamente à sequência nucleotídica ACCG(N₄)GCCT (McBride *et al.*, 1991). Existem 4 sítios de ligação para E2 na LCR dos HPV-16 e -18 (Bernard, 2002). Em baixos níveis, E2 atua como um ativador transcripcional. No HPV-16, supõe-se que os sítios de ligação 1 e 2 são os primeiros a serem ocupados, levando à ativação do promotor. Com o aumento nos níveis de E2, a ocupação dos demais sítios de ligação impede a ligação dos fatores de transcrição Sp1 (*Transcription Factor Specificity Protein 1*) e TBP (*TATAbox Binding Protein*) que são necessários para a ativação do promotor (Dong *et al.*, 1994).

Proteína ativadora 1 (Activator Protein-1 - AP-1): AP-1 se liga ao sítio de ligação como heterodímeros formados por proteínas derivadas das famílias de genes *jun* e *fos* (Zerial *et al.*, 1989). Foi sugerido que o heterodímero junB e fra-2 que reconhecem sítios de ligação para AP-1 na LCR do HPV-18 estariam presentes apenas em queratinócitos (Thierry *et al.*, 1992; Bouallaga *et al.*, 2000). Desta forma, AP-1 poderia contribuir para a ativação epitélio-específica do *enhancer*, tendo um papel crítico durante a expressão de genes precoces do HPV, em particular na expressão das oncoproteínas E6 e E7 (O'Connor *et al.*, 1995).

Fator nuclear 1 (*Nuclear Factor 1* - NF1): Atribui-se a NF1 também parte da especificidade epitelial do *enhancer* do HPV. Esse gene é expresso a partir de um dentre quatro genes de uma mesma família, dependendo do tipo celular. Em células epiteliais, NF1 é composto principalmente de subunidades derivadas do gene NF1-C, cujos produtos ativam a transcrição do HPV. Em células não epiteliais, entretanto, NF1 é composto principalmente de subunidades derivadas do gene NF1-X, cujos produtos não ativam a transcrição viral (Apt *et al.*, 1993, 1994).

Fator de ligação em octâmero -1 (*Octamer Binding Factor -1*, Oct-1): Quando presente em células epiteliais em concentrações fisiológicas, Oct-1 se liga a NF-1 estabilizando a ligação deste ao seu sítio de reconhecimento. Esse evento provoca um aumento dos níveis de transcrição do genoma viral (O'Connor e Bernard, 1995).

Elementos de Resposta à Progesterona (*Progesterone Response Element*, PRE) e a glicocorticóides (*Glucocorticoid Response Element*, GRE): Elementos de resposta à progesterona e a glicocorticóides estão presentes em *enhancers* de alguns HPV genitais. PRE e GRE estimulam a transcrição viral, o que resulta na transformação aumentada de células em cultura (Chan *et al.*, 1989; Pater *et al.*, 1988). Essas observações *in vitro* fornecem uma explicação molecular para a evidência epidemiológica de que mulheres que são expostas a altos níveis de progesterona por longos períodos apresentam um maior risco de desenvolverem câncer cervical (Smith *et al.*, 2003).

Fator YY1 (*Yin-Yang Factor -1*): YY1 é um fator de transcrição multifuncional que ativa ou reprime a transcrição de muitos genes celulares e virais. Essa versatilidade funcional pode ser atribuída aos seus múltiplos domínios transcricionais. Foi demonstrado que YY1 atua sobre a transcrição dos HPV-16 e -18. No HPV-16, atua como um repressor transcricional (Galvin e Shi, 1997), enquanto que no HPV-18 o fator YY1 ativa a transcrição. A proteína YY1 pode reprimir a transcrição suprimindo a atividade de AP-1 (O'Connor *et al.*, 1996) por competir com AP-1 pela ligação a seus respectivos sítios, que estão sobrepostos na LCR do HPV-16 (Dong e Pfister, 1999). No contexto da LCR completa do HPV-18, YY1 atua como um ativador ao formar um complexo com C/EBP β e se ligar à região localizada a montante do sítio de ligação de YY1 próximo ao promotor. Os resultados sugerem que o complexo C/EBP β -YY1 é um regulador positivo do HPV-18, tendo um papel crítico na regulação da atividade da LCR (Bauknecht e Shi, 1998).

C/EBP β (*CCAAT Enhancer Binding Protein - beta*): C/EBP é um membro de uma família de fatores transcricionais envolvidos na diferenciação celular. Em células

infectadas por HPV-18, um aumento nos níveis de C/EBP β resulta em forte repressão da atividade da LCR, por impedir a ligação da proteína TBP, componente do complexo de iniciação da transcrição, ao sítio de reconhecimento TATA-box na LCR (Bauknecht e Shi, 1998).

Sp1 (*Transcription Factor Specificity Protein 1*): Foi demonstrado que Sp1 é essencial para a transcrição viral a partir do promotor de E6/E7, possivelmente por Sp1 facilitar a ligação de TBP ao TATA-box na região promotora, aumentando o acesso desse fator ao seu sítio de reconhecimento na LCR (Gloss *et al.*, 1990; Tan *et al.*, 1994; Rose *et al.*, 1998).

c-Myc (*Cellular Myelocytomatosis Oncogene*): Os genes *c-myc* compreendem uma pequena família de genes cuja expressão está envolvida no surgimento de diferentes tipos de tumores em humanos. Na sua forma dimerizada com a proteína c-Max, c-Myc requer sequências específicas de ligação ao DNA (Berberich *et al.*, 1992). A ligação deste dímero à LCR é capaz de aumentar a expressão viral dirigida pelo promotor de E6/E7 de HPV-16 (Nünberg *et al.*, 1995). Adicionalmente, a expressão desregulada de *c-myc* leva à um aumento na proliferação celular, inibe a diferenciação celular, reduz a adesão celular e promove metástase e instabilidade genômica. Muitos cânceres, inclusive o câncer cervical, apresentam níveis elevados de c-Myc (Abba *et al.*, 2004; Adhikary e Eilers, 2005).

2.5. O câncer do colo do útero

Muitas mulheres adquirem infecções por HPV na adolescência através de transmissão sexual. Em aproximadamente 80% dessas mulheres, a infecção é transitória, e não resulta em anormalidades epiteliais. Nas 20% restantes, a infecção por HPV resulta no desenvolvimento de lesões no colo uterino além de infecção persistente, um pré-requisito para a transformação maligna (Villa, 1997; Ho *et al.*, 1998) (Figura 8).

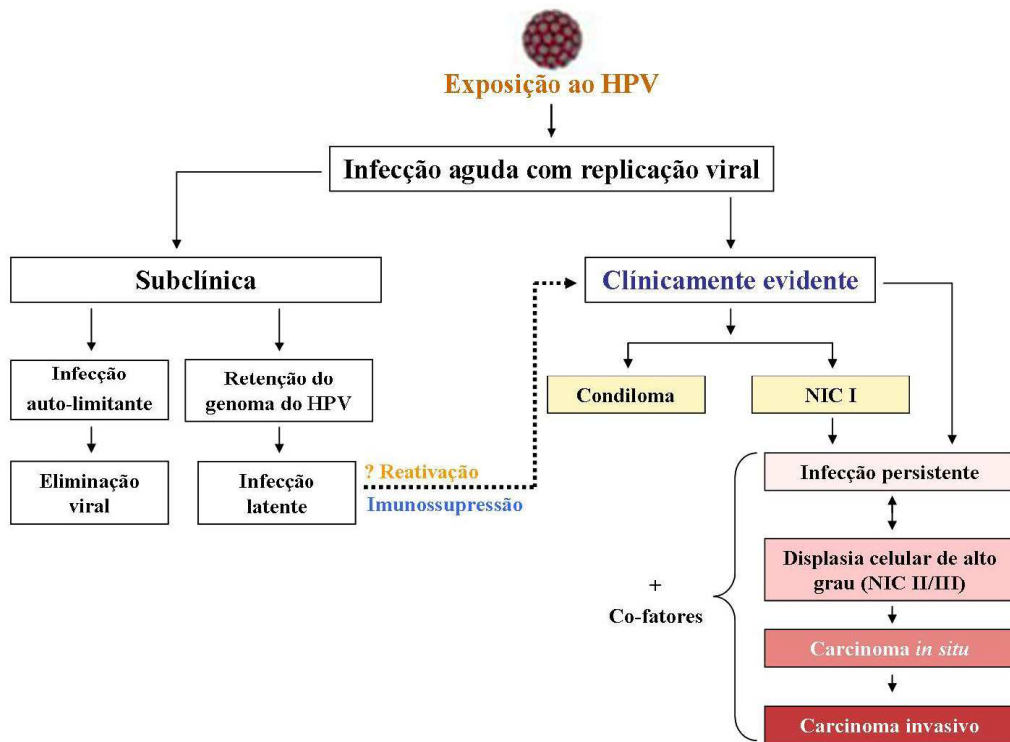


Figura 8. História natural da infecção pelo HPV. A maior parte das infecções por HPV é subclínica (sem sintomas). A resposta imune pode erradicar a infecção ou suprimir-la a níveis não detectáveis. Algumas infecções são suprimidas, mas o genoma do HPV é mantido em estado latente (infecção subclínica com um pequeno número de células mantendo poucas cópias virais). Ainda não está claro como ocorre a latência em hospedeiros imunocompetentes e os mecanismos que levam à reativação do HPV a um estado detectável. Fonte: Modificado de Merk (2006).

O câncer cervical progride a partir de lesões pré-malignas não invasivas, denominadas neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) ou lesões intraepiteliais escamosas (*squamous intraepithelial lesions* – SIL). Essas lesões pré-malignas são classificadas histologicamente com base nas atipias das células epiteliais: NIC I corresponde a uma displasia branda; NIC II à displasia moderada e NIC III à displasia severa e carcinoma *in situ*. NIC I é também classificada citologicamente como lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (*low-grade SIL* – LSIL) e NIC II/III como lesão intraepitelial escamosa de alto grau (*high-grade SIL*– HSIL). A infecção, tanto por HPV oncogênicos como não oncogênicos, pode causar LSIL na cérvix uterina, enquanto que a maioria das lesões cervicais classificadas como HSIL, carcinoma *in situ* ou câncer invasivo apresenta infecção por tipos oncogênicos do HPV (Baseman e Koutsky, 2005; Doorbar, 2006) (Figura 9).

Acreditava-se, até recentemente, que o câncer cervical sempre progredia a partir de lesões cervicais de baixo grau para moderado e, posteriormente, para de alto grau. Estudos de história natural, entretanto, têm questionado a noção de estágios pré-cancerosos progressivos contínuos e levado os pesquisadores a concluir que lesões cervicais de baixo e alto-grau são processos distintos de infecção por HPV. LSIL parece ser uma manifestação transitória da infecção viral produtiva, onde o epitélio infectado por HPV passa pela diferenciação e maturação e exibe apenas pequenas anormalidades celulares. HSIL, precursor do câncer cervical, ocorre quando a infecção pelo HPV impede a diferenciação de células epiteliais, levando à replicação celular contínua e ao acúmulo de anormalidades genéticas, que levam ao surgimento de células cancerosas. LSIL pode se estabelecer antes, ao mesmo tempo, ou na ausência de HSIL (Moscicki *et al.*, 2006).

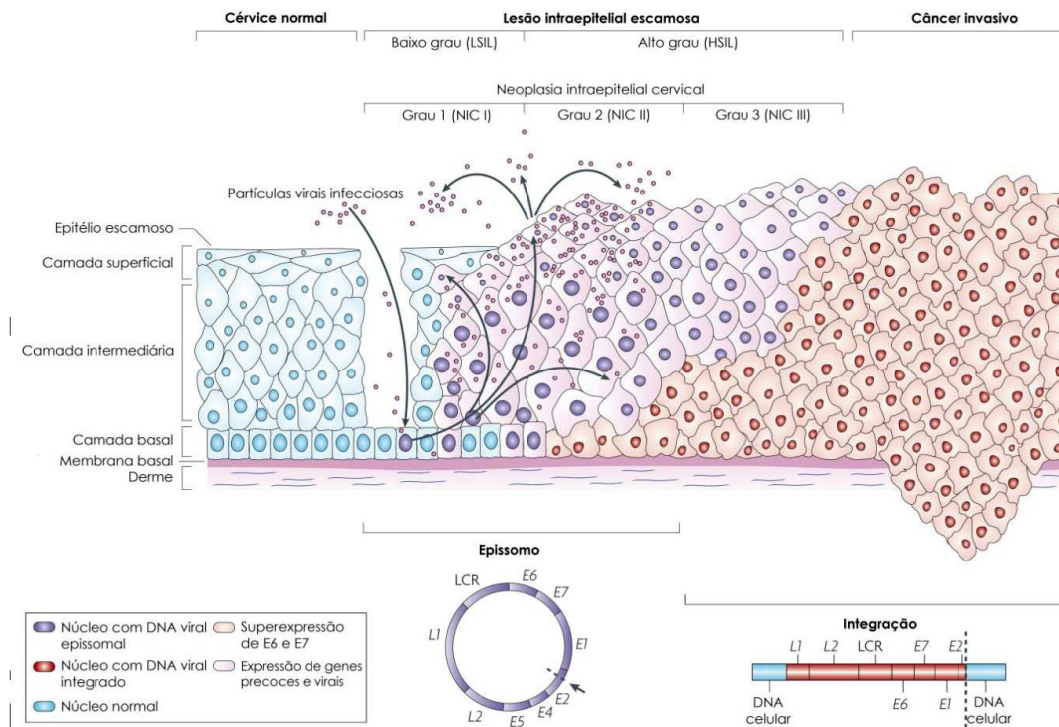


Figura 9. Progressão das lesões do colo do útero. As células da camada basal do epitélio cervical se localizam sobre a membrana basal, que é sustentada pela derme. Os HPV acessam as células basais por meio de micro abrasões no epitélio cervical. Após a infecção, os genes precoces E1, E2, E4, E5, E6 e E7 são expressos e o DNA viral se replica como DNA epissomal (núcleo roxo). Nas camadas superiores do epitélio (camadas intermediária e superficial) o genoma viral é replicado em maior escala, e os genes E4, L1 e L2 são expressos. L1 e L2 promovem a encapsidação dos genomas virais no núcleo, iniciando novas infecções. Nas lesões epiteliais de baixo grau ocorre a replicação viral produtiva. Uma parte das infecções por HPV de alto risco progredem para a neoplasia intraepitelial de alto grau (NIC III). A progressão de lesões não tratadas ao câncer invasivo está associada com a integração do genoma do HPV ao cromossomo do hospedeiro (núcleo vermelho), com a perda ou rompimento de E2, e a subsequente superexpressão dos oncogenes E6 e E7. Fonte: Modificado de Woodman *et al.* (2007).

2.5.1. *Co-fatores no desenvolvimento do câncer cervical*

Embora muitas mulheres sejam infectadas por HPV, a maioria não irá desenvolver o câncer cervical. Portanto, outros fatores provavelmente estão envolvidos no desenvolvimento desta neoplasia. Os três principais grupos de co-fatores são (Muñoz *et al.*, 2000):

- Co-fatores ambientais ou exógenos, incluindo contraceptivos hormonais, tabagismo, número de partos e co-infecções com outros agentes sexualmente transmissíveis;
- Co-fatores virais, como infecção por tipos oncogênicos de HPV, co-infecção com outros tipos de HPV ou variantes, carga viral e integração viral;
- Co-fatores do hospedeiro, incluindo hormônios endógenos, fatores genéticos e outros fatores relacionados à resposta imune.

O número elevado de partos leva à manutenção da zona de transformação na exocérvice por longos períodos, sendo associada a um maior risco de desenvolvimento de lesão cervical (Autier *et al.*, 1996). Desta forma, esse fator de risco poderia permitir uma exposição mais prolongada da zona de transformação ao HPV. Os efeitos do tabagismo no desenvolvimento do carcinoma incluem redução da resposta imune na cérvice uterina e dano genético direto causado pela carcinogênese relacionada ao tabaco (Vaccarella *et al.*, 2008). Os contraceptivos hormonais podem agir como co-fatores no desenvolvimento do câncer cervical devido ao aumento da expressão gênica do HPV na cérvice através de elementos de resposta a hormônios (estrógeno e/ou progesterona) presentes na LCR do HPV (Chan *et al.*, 1989).

Fatores genéticos também podem constituir um risco adicional para o desenvolvimento do câncer do colo do útero. Os polimorfismos nos genes HLA (*human leucocyte antigen*), cujas proteínas expressas estão envolvidas na apresentação de peptídeos antigênicos às células T CD4+, parecem estar envolvidos na susceptibilidade genética ao desenvolvimento de câncer cervical (Maciag *et al.*, 2002). A resposta imunológica do hospedeiro também parece ser um fator importante no desenvolvimento de câncer cervical, uma vez que mulheres infectadas com HIV têm uma probabilidade aproximadamente quatro vezes maior de serem infectadas por HPV. Além disso, a infecção por HPV em mulheres co-infectadas com HIV tem maior probabilidade de se tornar persistente (del Mistro e Bianchi, 2001).

2.5.2. Prevenção

A estratégia mais utilizada para prevenção do desenvolvimento do câncer de colo do útero é o exame de Papanicolau. Este baseia-se na coloração de células epiteliais obtidas da cérvix, na expectativa de que anormalidades nucleares detectáveis sejam representativas de lesões subjacentes definidas histologicamente. Esse exame reduz a incidência do câncer de colo do útero ao permitir a detecção, possibilitando a excisão das neoplasias intraepiteliais cervical (NIC) ou do adenocarcinoma *in situ* (AIS) antes do desenvolvimento do câncer invasivo. Apesar de o diagnóstico ser subjetivo, o exame de Papanicolau é considerado o procedimento de maior sucesso no controle do câncer cervical, sendo observada uma redução em até 70% na incidência de câncer cervical, com a aplicação efetiva desse exame em países desenvolvidos (Bosch e Harper, 2006).

2.5.3. Vacinas contra o câncer cervical

Nos últimos anos as atenções se voltaram para a possibilidade de prevenir lesões pré-cancerosas e o câncer cervical por meio de vacinação contra o HPV (Harper *et al.*, 2004; Reddy *et al.*, 2004; Franco e Harper, 2005; Villa *et al.*, 2005; Lowy e Schiller, 2006). As duas vacinas profiláticas que foram desenvolvidas e comercializadas, até o momento, têm como alvos erradicar as infecções por HPV-16, -18, -6 e -11 (Harper *et al.*, 2004; Villa *et al.*, 2005). Esses tipos de HPV foram escolhidos devido aos HPV-16 e -18 serem os tipos mais frequentemente associados ao desenvolvimento do câncer cervical no mundo, e responsáveis por cerca de 70% dos casos de câncer de colo do útero e neoplasias intraepiteliais de alto grau; e os HPV de baixo risco -6 e -11 causarem cerca de 90% das verrugas anogenitais. A vacina fabricada pelo laboratório Merck Sharp e Dhome, internacionalmente conhecida como Gardasil®, é uma vacina quadrivalente que apresenta partículas semelhantes à vírus (VLP - *virus like particles*) dos HPV-16, -18, -6 e -11 (Villa *et al.*, 2005), e a desenvolvida pela empresa Glaxo SmithKline, denominada Cervarix®, é uma vacina bivalente, contendo VLP dos HPV-16 e -18 (Harper *et al.*, 2004). As vacinas mostraram uma eficiência de 100% na proteção contra o desenvolvimento de lesões cervicais pré-cancerosas e, no caso da Gardasil®, verrugas genitais causados pelos tipos de HPV presentes na vacina, com pouco ou nenhum efeito colateral. A expectativa é de que os efeitos de proteção das vacinas durem pelo menos quatro anos e meio a partir do início da vacinação. Ambas as

vacinas foram aprovadas pelas autoridades regulatórias dos Estados Unidos e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil.

Em adição às vacinas preventivas, estão sendo realizadas pesquisas para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra HPV. Em geral, essas vacinas têm como alvo as oncoproteínas E6 e E7. Dessa forma, espera-se que a resposta imune contra essas duas oncoproteínas possa erradicar os tumores já estabelecidos (Roden *et al.*, 2004).

As vacinas contra HPV prometem contribuir muito para a prevenção do câncer cervical. Entretanto, algumas questões ainda não foram suficientemente discutidas, como a população alvo, a duração da proteção, o custo, a aceitação pública e o potencial para distribuição mundial (Speck e Tyring, 2006). Além disso, não está clara a extensão em que ocorre reatividade cruzada na resposta imune entre variantes intratipo e entre tipos do HPV. Substituições de aminoácidos observadas na proteína L1 de HPV-16 e localizadas perto de epítomos neutralizantes sugerem que infecções por variantes podem evoluir para o escape da neutralização pelo sistema imune do hospedeiro (Varsani *et al.* 2006). Assim, mutações pontuais poderiam afetar seriamente a eficácia das vacinas contra HPV, sendo importante determinar os efeitos das mutações sobre a neutralização. Além disso, é possível que a esperada diminuição do número de infecções pelos tipos contemplados nessas vacinas seja acompanhada pelo aumento de infecções por outros tipos de HPV mucosotrópicos de alto risco.

2.6. Epidemiologia da infecção por HPV

Mundialmente, nota-se uma distribuição diversificada da prevalência dos diferentes tipos de HPV, no entanto, essa observação ainda tem determinantes desconhecidos. Estudo sobre a distribuição mundial dos tipos de HPV em mulheres assintomáticas revelam que o HPV-16 é o mais comum no mundo todo. Esse tipo foi, ao menos, duas vezes mais freqüente que qualquer outro tipo de alto risco oncogênico em todas as regiões, com exceção da África sub-Saariana, onde o HPV-35 é igualmente comum. Em seguida, os tipos de HPV mais comumente detectados no mundo entre mulheres citologicamente normais foram -42, -58, -31 e -18, com diferenças significativas entre as regiões. O segundo tipo de HPV mais comum foi o -33 na Ásia, -58 na América do Sul e -31 na Europa (Clifford *et al.*, 2005). Essa heterogeneidade na distribuição mundial dos tipos do HPV pode ter implicações no desenvolvimento e no impacto de testes de diagnóstico e vacinas (Figura 10).

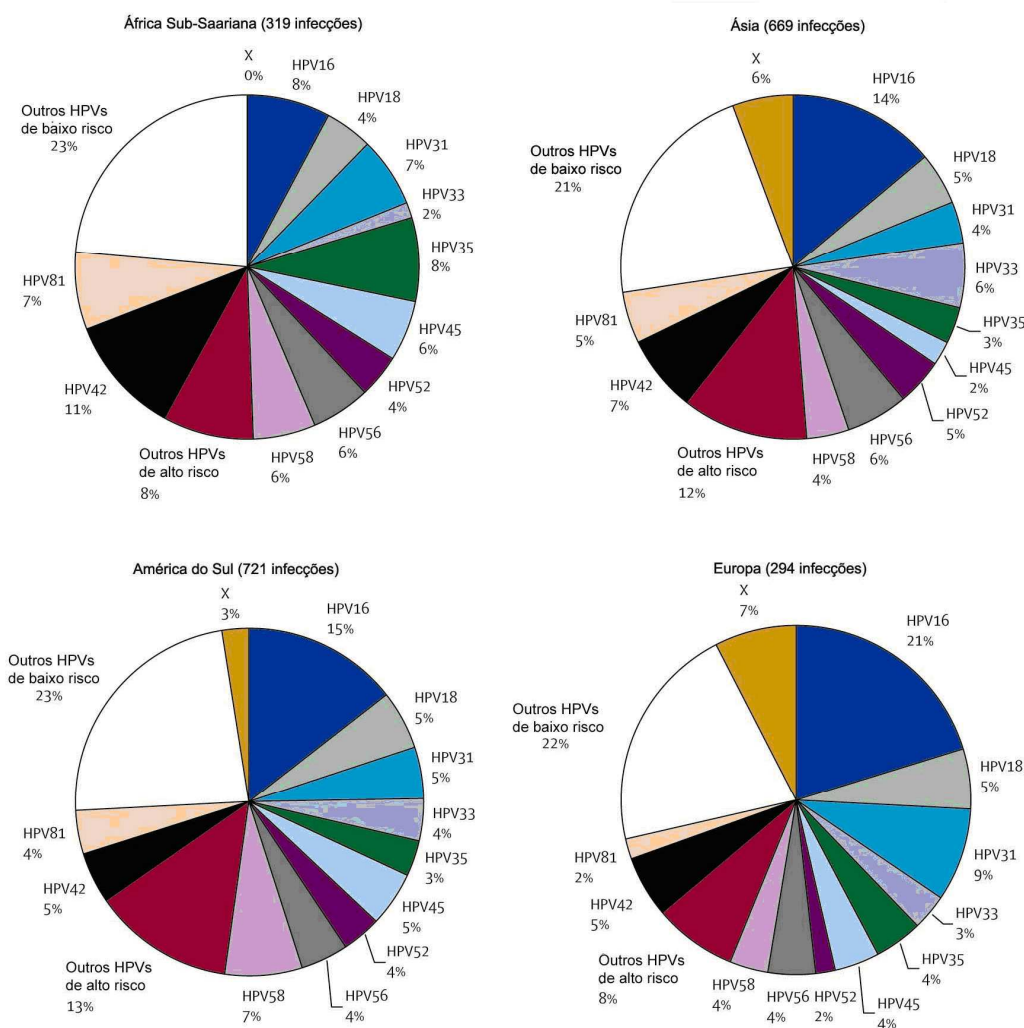


Figura 10. Distribuição de tipos de HPV em mulheres citologicamente normais por região. Fonte: Modificado de Clifford *et al.* (2005)

A associação de tipos específicos de HPV com lesões cervicais de alto grau refletem o maior potencial oncogênico desses tipos. Os HPV -6, -11 e -42 estão associados, principalmente, ao desenvolvimento de verrugas genitais benignas e NIC de baixo grau (Wiley *et al.*, 2002), enquanto outros tipos, como -16, -18 e, menos freqüentemente, -45, -31, -33, -58, -52, e -35, foram identificados como os principais causadores da maioria dos casos de câncer cervical e suas lesões precursoras de alto grau (Clifford *et al.*, 2003) (Figura 11).

O HPV-16 é encontrado em mais de 50% dos cânceres cervicais escamosos, seguido do HPV-18, enquanto que, nos casos de adenocarcinoma, se observa o contrário, sendo o HPV-18 mais prevalente que o HPV-16 (Arends *et al.*, 1993; Lizano *et al.*, 1997). Esses dois tipos virais são responsáveis por dois terços de todos os

carcinomas cervicais no mundo. Estima-se que o HPV-16 seja responsável por cerca de 60% dos cânceres cervicais, com o HPV-18 contribuindo com 10 a 20% (Clifford *et al.*, 2003).

Taxonomicamente, os HPV dos tipos -31, -33, -35, -52, -58 pertencem à espécie *Human Papillomavirus 16* do gênero *Alphapapillomavirus*, e estão entre os oito tipos de HPV mais prevalentes no câncer cervical invasivo (Clifford *et al.*, 2003) (Figura 3). Apesar de serem tipos virais relacionados ao HPV-16, as prevalências mundiais desses tipos no câncer cervical é bastante distinta (Figura 11). Comparado com a citologia normal, o risco relativo para câncer cervical invasivo dos tipos relacionados ao HPV-16 foi de 14,88, além de terem sido observados riscos elevados para os HPV-31 (RR= 3,4), -33 (RR= 3,4), -52 (RR =12,8) e -58 (RR= 11,2) (Ferrera *et al.*, 1999).

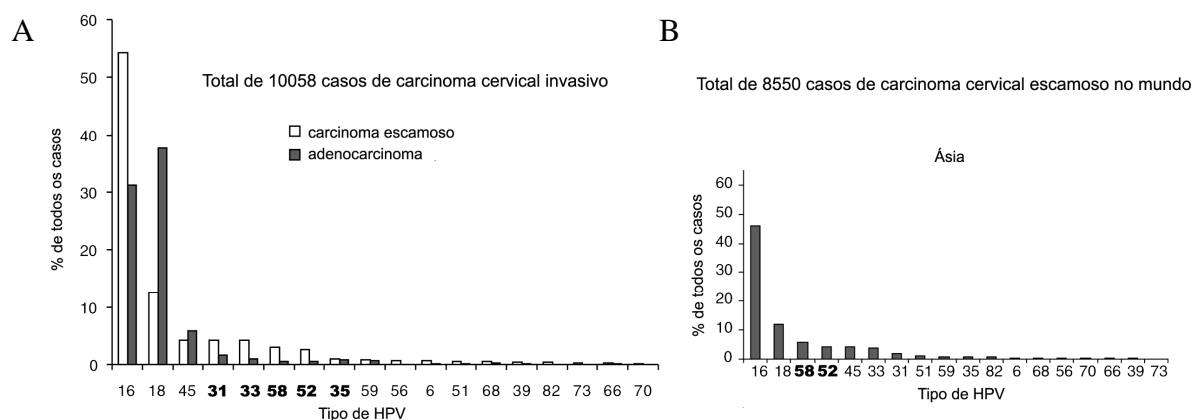


Figura 11. Distribuição de tipos de HPV no câncer cervical. (A) Número total de casos de câncer cervical no mundo por tipo histológico, (B) Número total de casos de câncer cervical na Ásia. Fonte: Modificado de Clifford *et al.* (2003).

É interessante observar que os HPV-52 e -58 são particularmente mais prevalentes na Ásia (Clifford *et al.*, 2003) (Figura 11). No Japão, o segundo genótipo mais comum entre lesões de alto grau é o HPV-58, cuja prevalência é de 15%, seguido do HPV-52 (12%) (Sasagawa *et al.*, 2001). Assim como no Japão, em Hong Kong, China, o segundo genótipo mais frequentemente detectado é o HPV-58 (23,8%). Nesse estudo, foi observado que o HPV-58 apresentou uma associação significativa com o desenvolvimento de NIC e carcinoma cervical (RR = 3,98), além de uma tendência significativa de aumento da prevalência desses tipos com o aumento da severidade das lesões (Chan *et al.*, 1999). Lin *et al.* (2006) também observaram que o HPV-52 é o segundo tipo de HPV mais prevalente (21,3%), seguido do HPV-58 (19,9%) em amostras de mulheres infectadas com tipos de alto risco em Taiwan, China. Além disso, o HPV-52 (23,2%) é o tipo de HPV mais

prevalente nas Filipinas em amostras de mulheres com lesão cervical, seguido dos HPV-16 (19,6%) e -58 (10,7%) (Miyashita *et al.*, 2009).

A alta prevalência do HPV-58 também tem sido relatada em outros continentes, em regiões geográficas específicas. Interessantemente, em um estudo na fronteira entre os Estados Unidos e o México, foi observado que o HPV-16 é o genótipo mais comumente encontrado, tendo sido detectado em 27,3% das mulheres mexicanas e em 12,5% das mulheres americanas que apresentavam lesões de alto grau. O segundo genótipo mais frequentemente detectado na população mexicana é o HPV-58, enquanto que, entre as mulheres americanas, é o HPV-18 (Giuliano *et al.*, 2001). Em um estudo com pacientes da população em geral na Espanha, as mulheres de origem latina apresentavam como segundo anticorpo mais prevalente o anti-HPV-58, o qual foi detectado em 42,7% das mulheres. Entretanto, entre as mulheres européias estudadas, o segundo anticorpo mais detectado foi o anti-HPV-31 (29,3%), seguido do anti-HPV-18 (24,1%) (Touze *et al.*, 2001).

Os dados sobre as prevalências dos diferentes tipos de HPV no Brasil ainda são bastante limitados, entretanto, a distribuição desses tipos não parece ser homogênea por todo país. Como relatado mundialmente, o HPV-16 (35,5%) é o tipo mais prevalente entre amostras de HSIL de mulheres do Rio de Janeiro, sendo o segundo tipo mais prevalente o HPV-18 (11,2%), seguido dos HPV-35 (4,6%) e -58 (3,9%) (Pereira *et al.*, 2007) Um estudo, realizado em Recife, Pernambuco, em amostras de mulheres com lesão cervical, mostrou que o HPV-16 (55,1%) é o tipo de HPV mais frequentemente detectado, seguido dos HPV-31 (15,6%), HPV-33 (10,2%), HPV-58 (8,2%) e HPV-18 (4,7%) (Lorenzato *et al.*, 2000). Em Belém, Pará, Noronha *et al.* (1999) observou que 21,2% das amostras de neoplasia intraepitelial cervical II e III (NIC II e III) apresentavam HPV dos genótipos -31, -33 e -58. Em estudos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa no Distrito Federal com amostras de lesão cervical, a prevalência do HPV-16 é de 49,2%, seguido pelo HPV-58 (13,43%). O HPV-31, terceiro tipo mais frequentemente detectado, apresentou uma prevalência de 11,9%; os HPV-18 e -33, 4,5%, sendo os quintos tipos mais prevalentes; e os HPV-35 e -52, sétimos tipos mais freqüentes, apresentaram a prevalência de 1,5% (Câmara *et al.*, 2003). A análise de amostras HIV positivas revelou a prevalência de HPV-16 e HPV-52 em 14,1% e 9,2%, das amostras, respectivamente. O terceiro genótipo mais prevalente é o HPV-35 (7,8%), seguido dos HPV-58 (4,7%) e -31 (3,1%) (Cerqueira *et al.*, 2007).

2.7. Estudos da variabilidade genética

Há indicações de que variantes do mesmo tipo de HPV diferem em suas propriedades biológicas e patogênicas (Xi *et al.*, 2007; Bernard, 2005). Tais diferenças podem contribuir para as disparidades na incidência de câncer cervical em todo o mundo. Variantes de um mesmo tipo de HPV também parecem apresentar diferenças quanto ao risco de progressão das lesões. A variabilidade genética dos HPV de alto risco, mais frequentemente ligados ao câncer anogenital, -16 e -18, têm sido extensivamente estudados (Xi *et al.*, 1997; Zehbe *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 2001; Tornesello *et al.*, 2000; Arias-Pulido *et al.*, 2005; de Boer *et al.*, 2004, 2005; Wu *et al.*, 2006; Xi *et al.*, 2006; Alencar *et al.*, 2007).

Estudos de variabilidade genética de isolados de HPV-16 e HPV-18 coletados nos 5 continentes revelaram uma co-evolução destes vírus com os três maiores ramos filogenéticos humanos (africanos, caucasianos e asiáticos) (Ho *et al.*, 1993; Ong *et al.*, 1993). A Figura 12 mostra a árvore filogenética do HPV-16, destacando os cinco clados nos quais os variantes foram agrupados: Europeu (E), Asiático (As), Asiático–Americano (AA), Africano 1 (Af-1) e Africano 2 (Af-2) (Ho *et al.*, 1993).

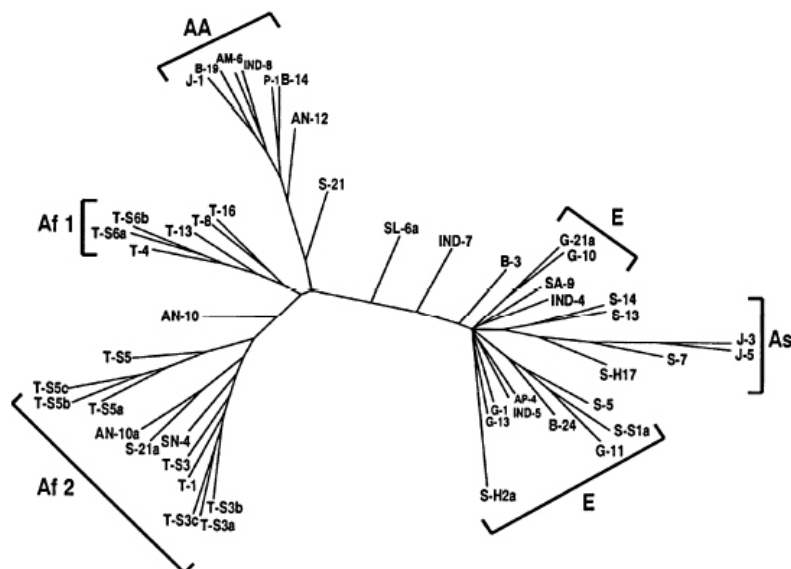


Figura 12. Árvore filogenética do HPV-16. Os variantes foram caracterizados baseado na seqüência de um fragmento de 364pb da LCR. Foram analisadas 301 amostras provenientes de 25 grupos étnicos distintos. Fonte: Ho et al. (1993).

Estudos foram realizados com o objetivo de investigar se os modelos de diversidade intratipo observados para os HPV-16 e -18 poderiam ser aplicados para outros HPV de alto risco associados ao câncer cervical. Esses estudos multicêntricos

analisaram a diversidade genética da LCR dos HPV-31, -35, -52 e -58 (Calleja-Macias *et al.*, 2004, 2005) e dos HPV-53, -56 e -66 (Prado *et al.*, 2005; Kocjan *et al.*, 2007). Além disso, Khouadri *et al.* (2006) analisaram filogeneticamente as sequências de variantes do HPV-33. Em geral, esses autores observaram poucas semelhanças com os padrões observados na análise de variantes dos HPV-16 e -18, mostrando uma alta conservação das sequências da LCR entre os variantes destes tipos virais. Alguns ramos com poucos isolados de lugares geográficos específicos foram encontrados entre os variantes dos HPV-31, -52, -53 e -56, além da ramificação dicotômica das árvores dos HPV-33, -35, -53 e -56, nunca antes descrita para variantes de HPV, e a ausência de qualquer associação geográfica para os variantes do HPV-58 e -66.

A análise filogenética de 67 amostras de HPV-31, nos quais foram detectados 28 variantes distintos, revelou a presença de dois ramos com poucos isolados de regiões restritas, um com amostras da África do Sul e outro com amostras do México (Calleja-Macias *et al.*, 2004, 2005) (Figura 13). Em ambos estudos conduzidos por Calleja-Macias *et al.* (2004) e Khouadri *et al.* (2006), 25 variantes de HPV-33 (Figura 14) e 12 variantes de -35 (Figura 15) analisados formaram dois agrupamentos marcadamente separados pela ausência ou presença de uma deleção de 78pb e uma inserção de 16pb, respectivamente, na LCR desses isolados, o que conferiu à árvore filogenética de ambos tipos virais uma topologia dicotômica. Similarmente à filogenia do HPV-16, foi sugerida a presença de um ramo Asiático-Nativo Americano, formado por isolados de Hong Kong, Taiwan, Tailândia, Brasil e México, na análise filogenética de 66 amostras do HPV-52 (Figura 16). A árvore filogenética de 97 isolados (21 variantes) do HPV-58 mostrou a mais alta conservação das sequências da LCR entre os tipos relacionados taxonomicamente ao HPV-16 (Figura 17).

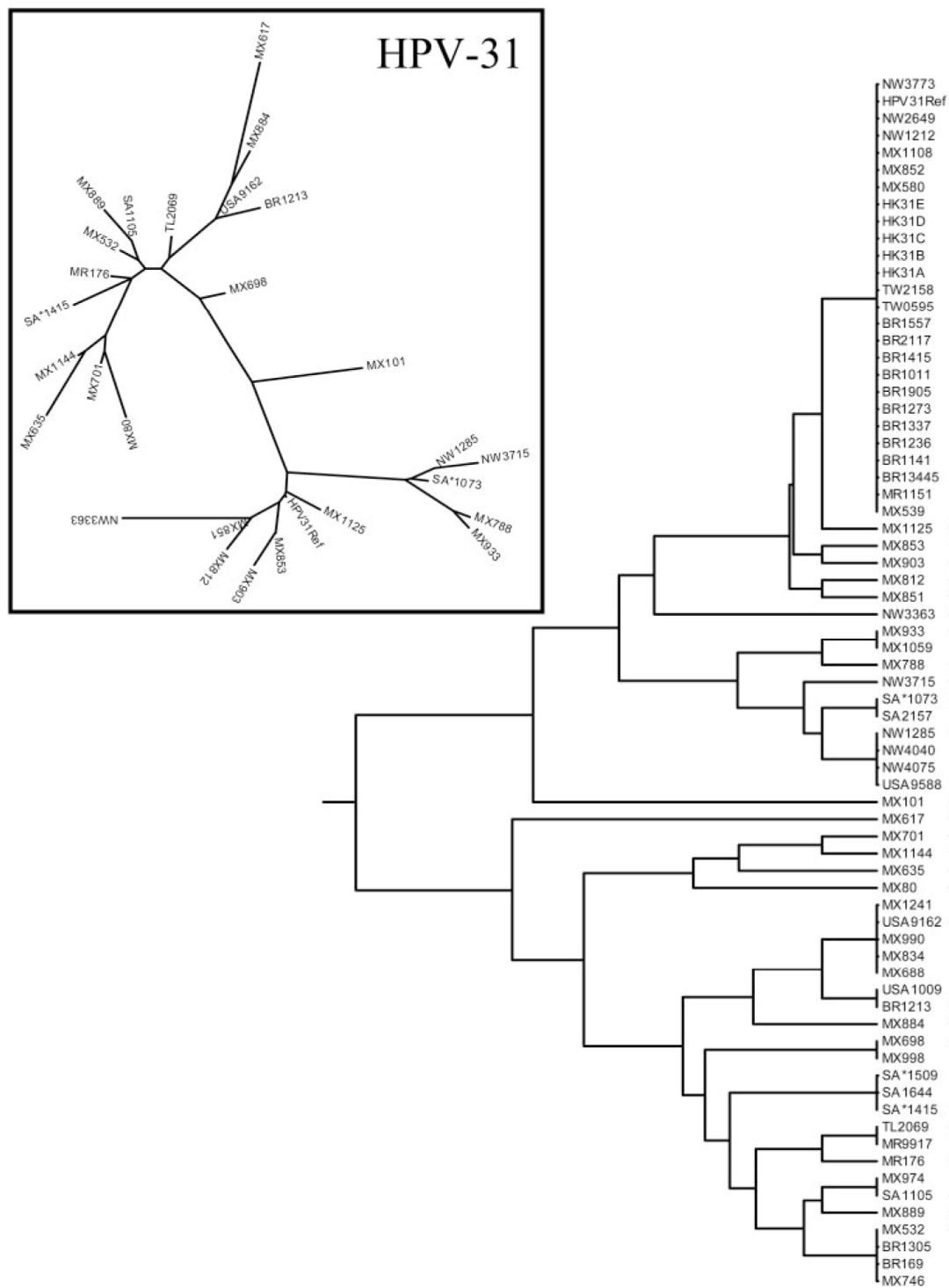


Figura 13. Diversidade intratípica do HPV-31. As árvores filogenéticas mostram a relação entre os 28 variantes obtidos a partir da análise da LCR de 67 amostras. Os triângulos indicam as sequências dos variantes detectados e utilizadas na árvore menor. São Paulo, Brasil (BR); Hong Kong (HK); Monte Rei, México (MX); Cidade do Cabo, África do Sul (SA); Estados Unidos (USA); Marrocos (MR); Noruega (NW); Mali (ML); Timor-Leste (TL); Taipei, Taiwan (TW). Fonte: Calleja-Macias *et al.* (2005).

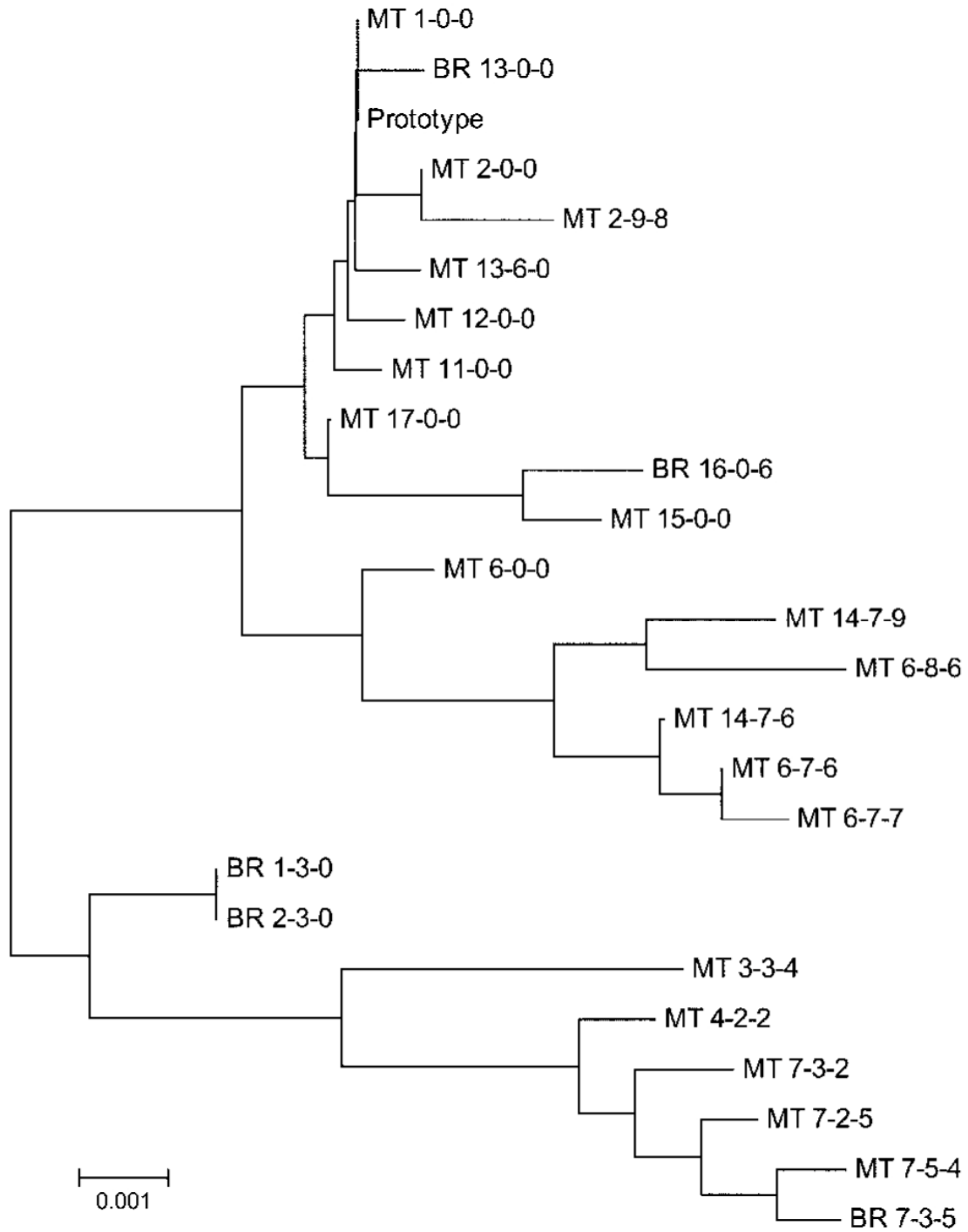


Figura 14. Diversidade intratípica do HPV-33. As árvores filogenéticas mostram a relação entre os 25 variantes obtidos a partir da análise da LCR de amostras de HPV-33. As árvores mostram a relação entre os nove variantes obtidos a partir da análise da LCR de 44 amostras. BR: São Paulo, Brasil; MT: Montreal, Fonte: Khouadri *et al.* (2006).

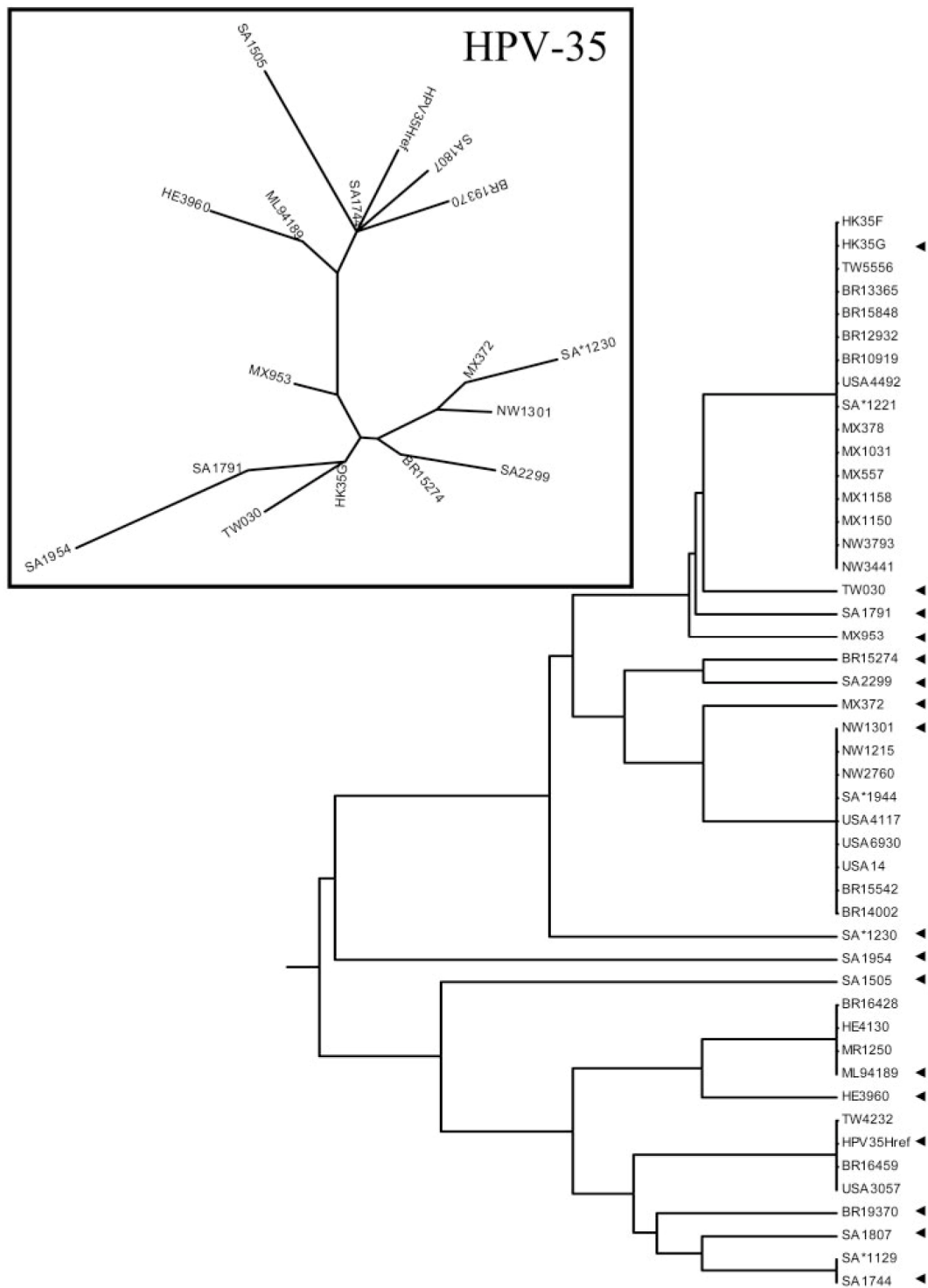


Figura 15. Diversidade intratípica do HPV-35. As árvores filogenéticas mostram a relação entre os 12 variantes obtidos a partir da análise da LCR de 46 amostras. Os triângulos indicam as sequências dos variantes detectados e utilizadas na árvore menor. São Paulo, Brasil (BR); Hong Kong (HK); Monte Rei, México (MX); Cidade do Cabo, África do Sul (SA) e Estados Unidos (USA); Marrocos (MR); Noruega (NW); Heidelberg, Alemanha (HE); Taipei, Taiwan (TW). Fonte: Calleja-Macias *et al.* (2005).

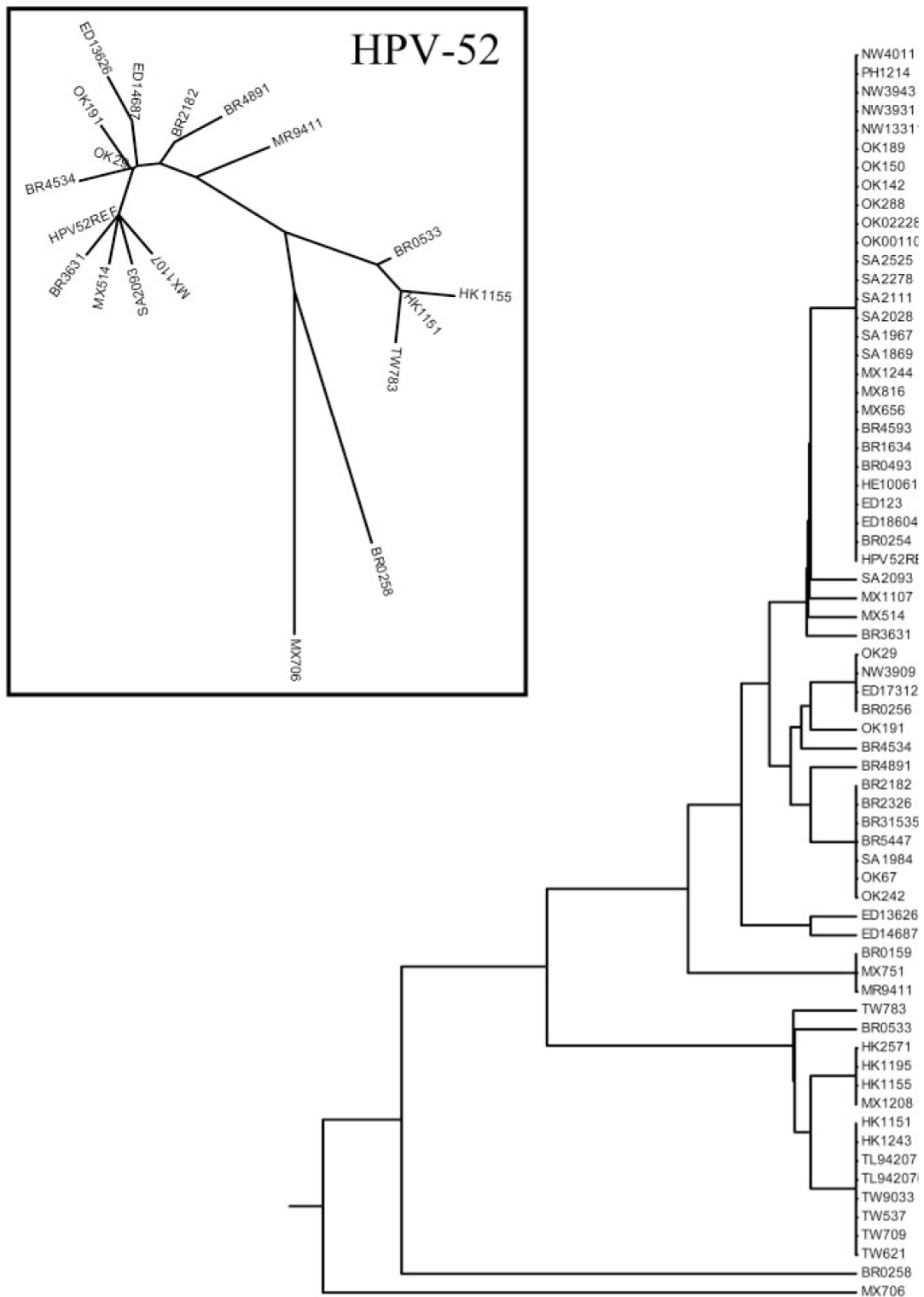


Figura 16. Diversidade intratípica do HPV-52. As árvores filogenéticas mostram a relação entre os 17 variantes obtidos a partir da análise da LCR de 66 amostras. Os triângulos indicam as sequências dos variantes detectados e utilizadas na árvore menor. São Paulo, Brasil (BR); Hong Kong (HK); Monte Rei, México (MX); Edimburgo, Escócia (ED); Cidade do Cabo, África do Sul (SA) e Oklahoma, Estados Unidos (OK); Marrocos (MR); Noruega (NW); Heidelberg, Alemanha (HE); Filipinas (PH); Taipei, Taiwan (TW). Fonte: Calleja-Macias *et al.* (2005).

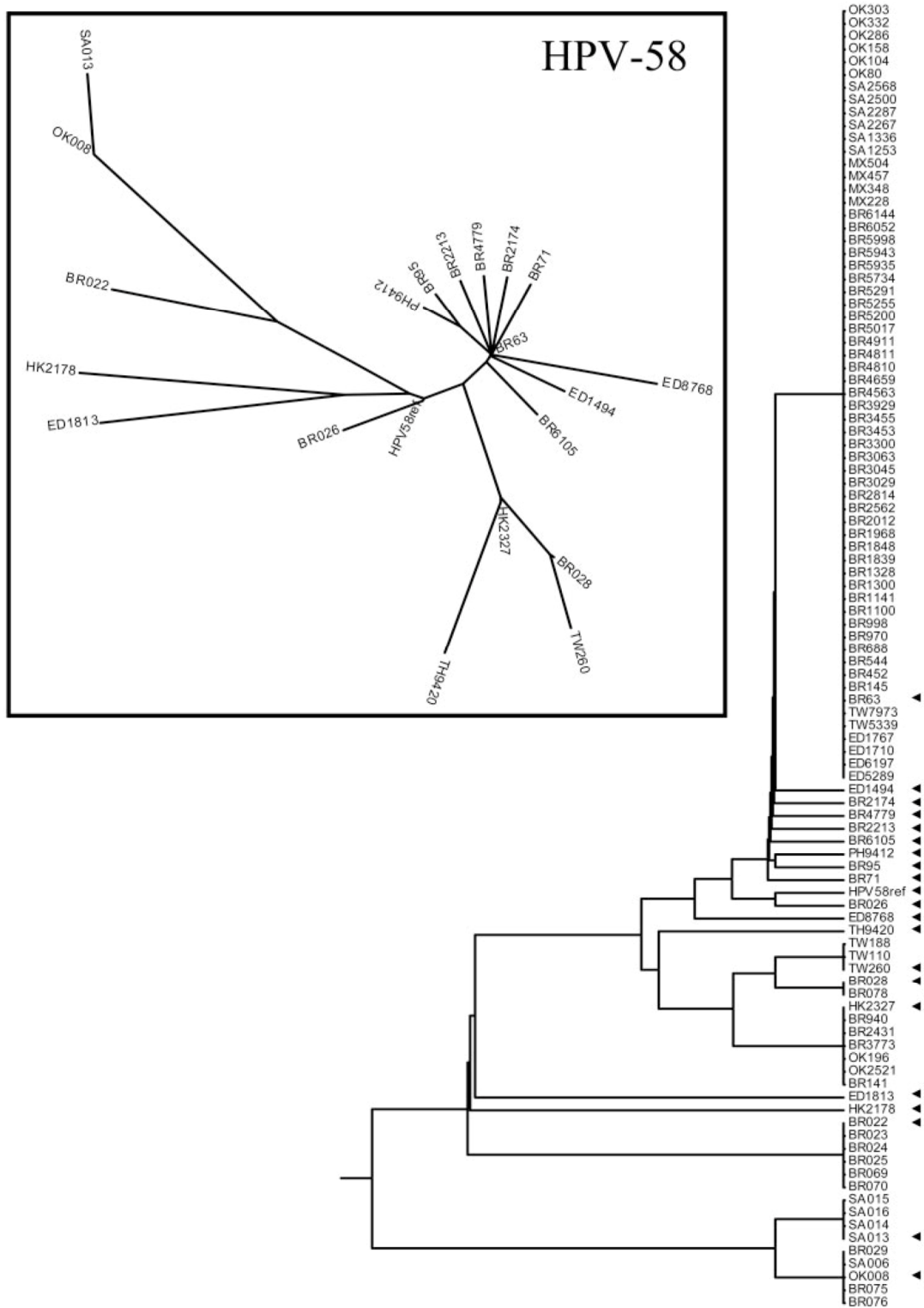


Figura 17. Diversidade intratípica do HPV-58. As árvores filogenéticas mostram a relação entre os 21 variantes obtidos a partir da análise da LCR de 97 amostras. Os triângulos indicam as sequências dos variantes detectados e utilizadas na árvore menor. São Paulo, Brasil (BR); Hong Kong (HK); Monte Rei, México (MX); Edimburgo, Escócia (ED); Cidade do Cabo, África do Sul (SA) e Oklahoma, Estados Unidos (OK); Taipei, Taiwan (TW) e Filipinas (PH). Fonte: Calleja-Macias *et al.* (2005).

2.8. Variabilidade genética e potencial oncogênico

Algumas diferenças na sequência de nucleotídeos encontradas entre os variantes de um tipo, podem levar a alteração nos aminoácidos codificados, levando a potenciais oncogênicos distintos entre os diferentes variantes. Mutações na sequência de nucleotídeos da região LCR poderiam resultar na perda da capacidade de ligação de um fator transcricional específico, na mudança do seu sítio de reconhecimento, aumentando ou diminuindo a afinidade de fator de transcrição específico, ou, ainda, na alteração de sua habilidade em interagir com outras proteínas (Bernard, 2002). Na proteína L1, uma ou mais alterações de aminoácidos poderia representar uma mudança conformacional na proteína do capsídeo e, assim, poderia afetar, também, a conformação de epitopos relevantes para neutralização viral (Sichero e Villa, 2006) (Tabela 1).

Diferentes estudos têm sido conduzidos com o intuito de analisar a associação entre um maior risco de infecção persistente e/ou desenvolvimento de lesões cervicais e variantes específicas dos HPV-16 e -18. Os diferentes tipos de HPV têm potencial oncogênico distinto e, da mesma forma, os variantes intratipo também podem apresentar oncogenicidade diferenciada. Vários estudos sugerem que os variantes Europeus estão associados a um menor risco de desenvolvimento de lesões de alto grau, enquanto que variantes não-Europeus estariam associados a um maior risco de incidência e prevalência dessas lesões (Xi *et al.*, 1997; Villa *et al.*, 2000; Berumen *et al.*, 2001, Hildesheim *et al.*, 2001; Xi *et al.*, 2006). Além disso, variantes não-Europeus, tanto do HPV-16 quanto do HPV-18, têm sido associados com um maior risco de infecções persistentes (Villa *et al.*, 2000; Xi *et al.*, 2006).

Tabela 1. Implicações funcionais da variabilidade genética do HPV. Fonte: Modificado de Sichero e Villa (2006).

Região variável	Implicações funcionais
LCR	Mudança na afinidade de ligação de diferentes fatores celulares de transcrição Criação ou eliminação de sítios de ligação de fatores transcricionais Mudança na atividade transcricional
E6	Maior ativação da telomerase Mudança na ligação e degradação de proteínas celulares Mudança na ativação de vias celulares Geração e manutenção do fenótipo transformado Monitoramento imune do hospedeiro
E7	Mudança na ligação a proteínas celulares Mudança na ativação de vias celulares Geração e manutenção do fenótipo transformado
E5	Mudança na atividade de transformação
L1	Alteração de epitopos de L1 dependentes de conformação e que são relevantes para neutralização viral
E2	Mudança na atividade transcricional Maior tendência de integração Maior eficiência na replicação

Até o momento, foram realizados poucos estudos sobre os variantes de outros tipos de HPV de alto risco menos prevalentes que os HPV-16 e -18. O conhecimento sobre a variabilidade genética desses tipos e sua relação com o desenvolvimento de câncer cervical, portanto, ainda é bastante limitado. Foi observada uma associação entre variantes específicos dos HPV-33, -35, -52 e -58 com a persistência da infecção e com a severidade da neoplasia. Gagnon *et al.* (2004) mostraram que a presença de uma deleção de 78pb na LCR de variantes de HPV-33 e polimorfismos específicos do gene E7 de variantes de HPV-35 estão associados com a persistência da infecção por esses vírus. Além disso, foi detectada uma associação entre um polimorfismo na sequência da LCR do HPV-33 e a presença de HSIL (Khouadri *et al.*, 2006). A variabilidade genética na LCR de variantes de HPV-52 também foi associada à persistência da infecção (Aho *et al.*, 2004). Na análise da diversidade das sequências de E6 e E7 de variantes de HPV-58 (Chan *et al.*, 2002) e -52 (Aho *et al.*, 2003), foi observado que a variabilidade genética era maior na região do gene E7 que em E6, em contraste com o HPV-16, onde E6 apresenta maior variabilidade que E7 (Zehbe *et al.*, 1998; Nindl *et al.*, 1999). Além disso, foi observado que variantes de E7 de HPV-58 contendo a substituição T20I/G63S estavam significativamente associados com o aumento do risco de desenvolver câncer cervical (Chan *et al.*, 2002).

3. Justificativa e Objetivos

Até o momento, poucos estudos foram realizados envolvendo os variantes de tipos de HPV de alto risco oncogênico menos prevalentes que os HPV-16 e -18. Estudos sobre a variabilidade genética intra-típica de HPV são importantes, visto a associação positiva de variantes específicos de HPV-16 e -18 e o risco de desenvolvimento de lesões cervicais (Xi *et al.*, 2006; Sichero *et al.*, 2007), além das diferenças bioquímicas e biológicas exibidas entre esses variantes (Stöppler *et al.*, 1996a; Choo *et al.*, 2000; Lichtig *et al.*, 2006).

A análise da atividade transcricional viral tem sido empregada no intuito de estabelecer relações entre substituições nucleotídicas específicas na LCR e diferenças no potencial de malignidade entre os diferentes variantes de HPV-16 e 18 (Veress *et al.*, 1999; Kämmer *et al.*, 2000; Tornesello *et al.*, 2000; Sichero *et al.*, 2005). Ao contrário do que é observado para os HPV-16 e -18, nenhum trabalho até o momento analisou a atividade transcricional de variantes de outros tipos de HPV de alto risco.

Em algumas regiões do Brasil, incluindo a Centro-Oeste, existe uma carência de dados sobre os variantes intratipo de HPV em amostras de câncer cervical, especialmente no que concerne a tipos menos prevalentes. Nosso grupo iniciou a caracterização de variantes dos HPV de alto risco oncogênico de amostras oriundas do Distrito Federal, além dos HPV-16 e -18. Cerqueira *et al.* (2003) e Veras *et al.* (2005) analisaram sequências de L1 de amostras do Distrito Federal previamente genotipadas como HPV-53, -58 e -66, permitindo a caracterização de novos variantes, contendo ou não substituições não silenciosas. A detecção de novos variantes também foi observada no estudo desenvolvido por Wyant (2007) onde foram analisadas a variabilidade genética da LCR e dos genes E6 e L1, além da filogenia dos HPV-53, -56 e -66.

Adicionalmente, as seqüências da LCR de variantes de HPV-58 foram objeto de pesquisa do nosso grupo de estudo. Três variantes de HPV-58 detectados no Distrito Federal foram caracterizadas juntamente com outras obtidas de amostras de HPV-58 oriundas de São Paulo, como parte do estudo internacional multicêntrico coordenado internacionalmente pelo Dr. Hans-Ülrich Bernard (Universidade da Califórnia-Irvine, EUA) e no Brasil pela Dra. Luisa Lina Villa (Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo) (Calleja-Macias *et al.*, 2005).

Devido à importância epidemiológica do HPV-58 em vários países do mundo, torna-se fundamental ampliar o conhecimento acerca de suas características e propriedades moleculares para que este tipo de HPV seja considerado na elaboração de vacinas e para compreender a associação do HPV-58 com determinadas populações, como o que é observado em alguns países da Ásia, América Latina e nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil (Câmara *et al.*, 2003, Chan *et al.*, 1999, Giuliano *et al.*, 2001, Lorenzato *et al.*, 2000, Noronha *et al.*, 1999, Touze *et al.*, 2001, Sasagawa *et al.*, 2001).

Estudos epidemiológicos mostraram que os HPV-31, -33, -35, -52 e -58 estão entre os dez tipos de HPV mais prevalentes em amostras de câncer cervical (Clifford *et al.*, 2003; IARC, 2007). O presente estudo teve como objetivo ampliar o conhecimento sobre a variabilidade genética desses tipos de HPV de alto risco oncogênico, além de verificar a possível implicação que as variações nucleotídicas na LCR podem ter sobre a atividade transcricional dos variantes de HPV-58 detectados no Distrito Federal. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram:

- 3.1. Gerar dados sobre a variabilidade genética da LCR e dos genes L1 e E6 de isolados de HPV-31, -33, -35, -52 e -58 encontrados no Distrito Federal;**
- 3.2. Descrever a composição de potenciais sítios de ligação para fatores transcricionais celulares e viral na LCR do variante protótipo destes tipos virais;**
- 3.3. Verificar quais alterações na sequência de nucleotídeos da LCR dos variantes moleculares poderiam estar associadas à diferenças na ligação de fatores de transcrição celulares e viral;**
- 3.4. Verificar se as variações nucleotídicas nos genes E6 e L1 resultam em substituições de aminoácidos conservativas ou não;**
- 3.5. Comparar a variabilidade genética das regiões LCR, E6 e L1 dos isolados do Distrito Federal com a descrita na literatura;**
- 3.6. Realizar a análise filogenética desses cinco tipos de HPV e comparar os resultados obtidos em outros estudos;**
- 3.7. Analisar a atividade transcricional dos variantes e mutantes de HPV-58 detectados no Distrito Federal;**
- 3.8. Divulgar os resultados obtidos por meio de publicações científicas e em eventos nacionais e internacionais sobre o tema.**

4. Material e Métodos

4.1. Procedência das amostras

Amostras de DNA de doze isolados de HPV-31, sete de HPV-33, seis de HPV-35, quatro de HPV-52 e oito de HPV-58 foram obtidas a partir da descamação de células do colo uterino de pacientes atendidas em hospitais da rede pública do DF e entorno em estudos conduzidos por Câmara *et al.* (2003) e Cerqueira *et al.* (2007). Para todas as pacientes, foram realizadas análises citológicas e ambos os estudos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde do Governo do Distrito Federal. Essas amostras foram previamente genotipadas por meio da amplificação de um fragmento do gene L1 com os iniciadores MY09/11, seguida da digestão do produto amplificado com sete enzimas de restrição (*Bam* HI, *Dde*I, *Hae*III, *Hinf*I, *Pst*I, *Rsa*I e *Sau*3AI) e posterior análise do perfil de digestão (Bernard *et al.*, 1994) ou por sequenciamento automático.

4.2. Amplificação do DNA Viral

Para a análise de variabilidade genética foram amplificadas as regiões genômicas LCR, E6 e L1 das amostras de HPV-31, -33, -35, -52 e -58 descritas anteriormente. Para a amplificação das regiões LCR e E6 de amostras de HPV-31, -35, -52 e do gene E6 de amostras de HPV-58 foram utilizados iniciadores específicos descritos por Calleja-Macias *et al.* (2004, 2005). Iniciadores específicos foram também desenhados para a amplificação da LCR e do gene E6 de amostras de HPV-33 e da LCR de amostras de HPV-58 (Tabela 2). Adicionalmente, as amostras de todos os tipos virais analisados foram amplificadas utilizando-se os iniciadores MY09/MY11 para a análise da sequência de um fragmento de aproximadamente 450pb do gene L1 (Manos *et al.*, 1989).

Tabela 2. Iniciadores específicos desenhados para a amplificação da região LCR do HPV-33 e do gene E6 dos HPV-33 e -58.

Iniciador *	Posição nucleotídica **	Sequência do iniciador	Tamanho do fragmento
33LCR-F	7057 – 7076	cacatcgtctgcaaaacgca	1027pb
33LCR-R	154 – 174	agttgtctccaatgcttgca	
33E6-F	29 - 50	gtagggtgtaaccgaaagcgg	573pb
33E6-R	580 - 601	tcctttaacgttgcttgctgc	
58LCR-F	7091 - 7115	cctactaccgtgcaccatccacc	878pb
58LCR-R	121 – 145	cgcagaggagaaaccacggacattg	

* Os iniciadores estão na orientação 5' → 3'.

** Posições relativas às sequências protótipos do HPV-33 (número de acesso: M12732) e HPV-58 (número de acesso: D90400), disponíveis no GenBank.

As reações de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foram realizadas no termociclador MJ Research PTC-100 (GMI, Minnesota, EUA), em um volume final de 50µL, contendo 10-15µL do material genômico obtido, 1,5mM de MgCl₂ (Invitrogen, Califórnia, EUA), 250µM de dATP, dCTP, dTTP e dGTP (Invitrogen, Califórnia, EUA), 40pmoles de cada iniciador e 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Califórnia, EUA). As seguintes condições foram adotadas: 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 1minuto, anelamento a 51 ou 55°C por 1minuto e alongamento a 72°C por 2minutos. A desnaturação do primeiro ciclo e o alongamento do último ciclo foram estendidos por 5 e 8 minutos, respectivamente.

Todas as reações de PCR incluíram controles negativos consistindo da mistura de reação, porém sem DNA. Os produtos de PCR obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio a 0,5%.

4.3. Clonagem dos produtos de PCR

4.3.1. Obtenção dos plasmídios recombinantes

Após a amplificação, 3 amostras de HPV-58 foram purificadas utilizando-se o *kit DNA and gel band purification* (Amersham Biosciences, Nova Jérsei, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, a eficiência da purificação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio a 0,5%. A reação de ligação dos produtos de PCR ao plasmídio pGEM-T *easy* (Promega, Madison, EUA) foi realizada seguindo as instruções do fabricante.

Além disso, os produtos de PCR de 8 amostras que apresentavam co-infecção por mais de um tipo de HPV também foram clonados em pGEM-T *easy* (Promega, Madison, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Este procedimento foi realizado para a seleção dos clones que apresentavam fragmentos de DNA referente a um dos cinco tipos de HPV analisados neste estudo. Foram sequenciados pelo menos dois clones do mesmo tipo viral para cada região genômica.

4.3.2. Transformação de bactérias *E. coli*

Os plasmídios recombinantes foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* da linhagem DH5 α , pelo método de choque térmico. Inicialmente, 10 μ L da solução contendo os plasmídios foram incubados com 300 μ L das células competentes em gelo por 30 minutos. Em seguida, as células foram submetidas a 42°C por 2 minutos, em banho-maria, e novamente transferidas para o gelo por 1 minuto. Foram adicionados aos tubos 700 μ L de meio líquido 2xYT (1,6mg/mL de triptona, 1,0mg/mL de extrato de levedura e 85,6mM de NaCl) que em seguida foram incubados a 37 °C por 1 hora. Após a incubação, os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 10.000 rpm na centrífuga Jouan A14/V1 (Jouan, St-Herblain, França), e 700 μ L do sobrenadante foram removidos por aspiração. As bactérias foram espalhadas em placas de Petri contendo meio sólido 2xYT (ágar a 1,5%), contendo 16,7 nmol de IPTG, 800ng de X-Gal e 4mg/mL de ampicilina.

As placas de Petri foram incubadas por aproximadamente 12 horas em estufa a 37°C. As colônias formadas foram de dois tipos: azuis, quando apenas o vetor recircularizado foi incorporado, e brancas, indicando a presença do fragmento de interesse inserido no vetor, uma vez que o gene Lac-Z fica interrompido. Assim, a enzima β -galactosidase não é codificada e, portanto, mesmo na presença do indutor (IPTG), o análogo da lactose (X-gal) não é clivado e, não há deposição do pigmento azul. As colônias brancas, correspondendo aos clones recombinantes, foram transferidas para um tubo contendo 6ml de meio de cultura líquido 2xYT e 6 μ l de ampicilina (50 μ g/ml), e incubadas a 37°C por aproximadamente 12 horas, sob agitação.

O DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o o kit *WisardTM Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, Madison, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

4.4. Sequenciamento de DNA

Os produtos de PCR que apresentaram o tamanho esperado foram purificados por precipitação com acetato de amônio 7,5M e etanol 100% e sequenciados automaticamente pelo método dideoxi-terminal fluorescente utilizando-se o *DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit* (MegaBACE™ Amersham Pharmacia Biotech, NY, USA), no Sistema *Molecular Dynamics MegaBACE 500 plus* (Amersham Pharmacia Biotech, NY, USA) no laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília, ou na plataforma de seqüenciamento da EMBRAPA – CENARGEN utilizando-se o *Kit ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). As reações de sequenciamento foram realizadas com os mesmos iniciadores utilizados para a amplificação das amostras. Os plasmídios recombinantes obtidos da clonagem dos produtos amplificados das amostras com infecção por múltiplos tipos de HPV foram sequenciados diretamente utilizando-se os iniciadores universais M13, que anelam na seqüência do vetor pGEM-T *easy* próximo ao sítio de clonagem múltiplo, amplificando, assim, a seqüência introduzida.

4.5. Análise das seqüências de DNA obtidas

A qualidade das seqüências obtidas nas reações de sequenciamento automático foi analisada pelo programa PHRED (Ewing *et al.*, 1998). As comparações foram realizadas usando-se o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1990), disponível no sítio www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. As seqüências foram analisadas quanto às divergências nucleotídicas em relação às seqüências protótipos dos HPV-31 (número de acesso: J04353), -33 (número de acesso: M12732), -35 (número de acesso: M74117), -52 (número de acesso: X74481) e -58 (número de acesso: D90400), disponíveis no GenBank, no sítio www.ncbi.nlm.nih.gov. O alinhamento das seqüências protótipos e das amostras em ambas as orientações foi realizado pelo programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) e otimizado por inspeção visual do cromatograma gerado para cada seqüência por meio do programa Chromas© (Technelysium Pty). As seqüências de aminoácidos foram deduzidas e comparadas à seqüência protótipo correspondente ao tipo dos isolados virais. A conservação das propriedades físico-químicas dos aminoácidos substituídos também foi verificada pelo programa BLAST.

As sequências da LCR dos isolados de HPV-31, -35, -52 e -58 foram utilizadas para a determinação da distância genética intratípica. Para tanto, a sequência de cada isolado de todos os tipos de HPV analisados foi comparada com as outras sequências caracterizadas neste estudo e, também, com aquelas disponíveis no GenBank do respectivo tipo viral. O mesmo procedimento foi aplicado às sequências de L1 dos isolados de HPV-33. As deleções e inserções detectadas foram consideradas como eventos únicos. As sequências dos variantes ainda não descritos na literatura foram depositadas no GenBank, com os seguintes números de acesso: LCR Bsb-36 - FJ202000; LCR Bsb-299 - FJ202001; E6 Bsb-216 - FJ202002; E6 Bsb-233 - FJ202003; L1 Bsb-23 - FJ202004; L1 Bsb-24 - FJ202005; L1 Bsb-31 - FJ202006; LCR Bsb-121 - FJ202007; LCR Bsb-15 - FJ202008; L1 Bsb-20- FJ202009; LCR Bsb-295 - FJ202010; LCR Bsb-329 - FJ202011; LCR Bsb-367 - FJ202012 (Anexo II).

4.6. Predição de sítios de ligação para fatores de transcrição na LCR

Prováveis sítios de ligação para fatores de transcrição na LCR dos HPV-31, -33, -35, -52 e -58 foram preditos utilizando-se as sequências protótipos de cada um dos cinco genótipos por meio do programa MATCH™ (Kel *et al.*, 2003), disponível no sítio www.gene-regulation.com/pub/programs.html#match. O programa MATCH utiliza uma biblioteca de matrizes de nucleotídeos do programa TRANSFAC® 7.0 (Wingender *et al.*, 1996) e procura sequências que combinem entre as matrizes de nucleotídeos que definem um sítio de ligação para um determinado fator de transcrição e uma sequência a ser analisada. Valores de *cut-off* e níveis de coincidência estabelecidos pelo programa foram utilizados a fim de minimizar o número de falsos negativos e falsos positivos. Nestas análises foram usadas as matrizes dos sítios de ligação dos fatores de transcrição AP-1, E2, GRE, NF-1, Oct-1, “TATA-box”, YY1, CEBP, Sp1 e c-Myc/c-Max, uma vez que já foi demonstrado que estes se ligam nas LCR dos HPV-16 e -18.

4.7. Análise filogenética

As sequências da LCR obtidas dos HPV-31, -35, -52 e -58 foram usadas na construção das árvores filogenéticas, juntamente com as sequências previamente descritas por Calleja-Macias *et al.* (2004, 2005) depositados no GenBank. Para a análise filogenética dos HPV-31, -35, -52 e -58 foram usados fragmentos da LCR de 503pb, 514pb, 631pb, e 607pb, respectivamente. No total foram utilizadas para a análise

filogenética, 79 sequências de HPV-31, 51 de HPV-35, 71 de HPV-52 e 102 de HPV-58.

Para a análise filogenética do HPV-33 foram utilizados fragmentos de 330pb do gene L1 gerados neste estudo, além de sequências de isolados descritos por Stewart *et al.* (1996) depositadas no GenBank, totalizando 9 sequências.

O alinhamento das sequências foi realizado por meio do programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) e a construção das árvores filogenéticas pelo método de Máxima Parsimônia utilizando-se o conjunto de programas PHYLIP (Lake, 1987). Os valores de *bootstrap* foram calculados pelo método UPGMA com algoritmo Log Det e 1000 réplicas. A sequência do *outgroup* utilizada em cada análise filogenética foi escolhida por meio da análise de Dot Plot no programa BioEdit (Hall, 1999). As árvores obtidas para os HPV-31, -35, -52 e -58 foram comparadas àquelas descritas por Calleja-Macias *et al.* (2005).

4.8. Análise da atividade transcricional do promotor de E6/E7 de variantes de HPV-58

4.8.1. Amplificação da LCR

Inicialmente, as amostras contendo os três variantes moleculares e a sequência protótipo do HPV-58 (Matsukura e Sugase, 1990) foram clonadas em pGEM conforme descrito no item 4.3.1. Em seguida, estes plasmídios foram utilizados para a amplificação de um fragmento do genoma de 794pb correspondendo à LCR completa. As sequências dos iniciadores utilizados encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. Iniciadores utilizados para a amplificação da LCR dos variantes de HPV-58.

Iniciador*	Posição nucleotídica**	Sequência do Iniciador***
H58LCR-F	7140 – 7158	cgtattGGTACCccattgtctgtgggtaat
H58LCR-R	91 – 115	atgacgAAGCTTggccgtgcgttagctacac

* Os iniciadores estão na orientação 5' → 3'.

** Posições relativas à sequência protótipo do HPV-58 (número de acesso: D90400), disponível no GenBank.

*** GGTACC e AAGCTT são as sequências reconhecidas pelas endonucleases de restrição *KpnI* e *BamHI*, respectivamente.

As amplificações foram realizadas no termociclador MJ Research PTC-100 (GMI, Minnesota, EUA), em um volume final de 50µL, contendo 50ng de cada plasmídio, 60mM de Tris-SO₄ (pH=8,9), 18mM de (NH₄)₂SO₄, 5mM de MgSO₄,

250µM de dATP, dCTP, dTTP e dGTP (Invitrogen, Califórnia, EUA), 2U de PLATINUM[®] *Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen, Califórnia, EUA) e 200nM de cada iniciador. As seguintes condições foram adotadas: 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 51 ou 55°C por 1 minuto e alongamento a 72°C por 2 minutos. A desnaturação do primeiro ciclo e o alongamento do último ciclo foram estendidos por 5 e 8 minutos, respectivamente. Os produtos de PCR obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio a 0,5% para verificação da qualidade do DNA.

Em seguida, os produtos de PCR foram purificados por meio do *kit Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega, Madison, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

4.8.2. Digestão dos produtos de PCR obtidos

Cada produto de PCR purificado foi digerido em uma reação contendo 1U de *Bam*HI e 4µl do respectivo tampão de reação (Biolabs, Massachusetts, EUA) em um volume final de 15µl. A reação foi incubada por 12 horas a 37°C, sendo em seguida a enzima inativada pela purificação do DNA utilizando o *kit Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega, Madison, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O DNA purificado foi digerido com 1U de *Kpn*I e 4µl do tampão de reação (Promega, Madison, EUA) em um volume final de 15µl. A reação foi incubada a 37°C por 12 horas, sendo em seguida a enzima inativada da mesma maneira anteriormente descrita. Além dos fragmentos de PCR, o vetor pGL3-Basic (Promega, Madison, EUA) foi digerido nas mesmas condições.

4.8.3. Ligação dos produtos de PCR ao vetor pGL3-Basic

Anteriormente à ligação aos amplicons referentes à LCR completa dos variantes moleculares, o vetor pGL3-Basic foi tratado com fosfatase alcalina (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, Invitrogen, Califórnia, EUA), seguindo as instruções do fabricante, visando minimizar a sua re-circularização. A fosfatase alcalina foi inativada pela purificação do vetor utilizando-se o *kit Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega, Madison, EUA). Quatro microlitros do vetor e das amostras purificadas foram submetidos à eletroforese por eletroforese em gel de agarose 1%

corado por brometo de etídio a 0,5%, juntamente com o marcador *Low DNA Mass* (Invitrogen, Califórnia, EUA) a fim de quantificar os DNA obtidos.

Na reação de ligação foram utilizados de 25 a 50ng do produto de PCR digerido e de vetor de maneira que se pudesse obter uma relação 4 de fragmento:1 de vetor em número de moléculas. Para isso considera-se o tamanho dos fragmentos de DNA e as respectivas concentrações. A ligação foi realizada utilizando-se 1µl de T4 DNA ligase (400 U/µl, Biolabs, Massachusetts, EUA), 2µl de tampão de reação 10X em um volume final de 20µl a 16°C por 16 horas. Finalmente, a ligase foi inativada utilizando-se o *kit Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega, Madison, EUA).

4.8.4. Transformação e obtenção dos plasmídios recombinantes

A transformação foi realizada conforme descrito no item 4.3.2, exceto pela utilização de bactérias *E.coli* JM109. Os plasmídios foram extraídos utilizando-se o *kit WizardTM Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, Madison, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

4.8.5. Mutagênese Sítio-Dirigida

Para a construção das sequências virais mutantes foi utilizado o *kit GeneTailorTM Site-Directed Mutagenesis System* (Invitrogen, Califórnia, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados como molde os vetores recombinantes contendo a LCR completa do variante Bsb-367 e da sequência protótipo do HPV-58, a montante do gene da luciferase, no vetor pGL3-Basic. Em resumo, 100ng de DNA de cada vetor foram incubados com DNA metilase a 37°C por 1 hora. O DNA metilado foi posteriormente amplificado em uma reação de PCR mutagênica utilizando-se dois iniciadores que se sobrepõe, sendo que um deles possui a mutação alvo. O produto desta reação é linear dupla fita. Os iniciadores utilizados para a amplificação dos vetores estão apresentados na Tabela 4. O nucleotídeo marcado em negrito no iniciador HPV-58mut-F insere a mutação de G para A na posição 7788 na sequência da LCR dos plasmídios gerados.

Tabela 4. Iniciadores utilizados para a mutagênese sítio-dirigida da LCR de HPV-58.

Iniciador*	Posição nucleotídica**	Sequência do Iniciador
HPV-58 mut-F	7788 – 7801	aggtgtggactaacccgttttAggtcacattgttc
HPV-58 mut-R	7757 – 7787	catttattgccaggtgtggactaacccgtttt

* Os iniciadores estão na orientação 5' → 3'.

** Posições relativas à sequência protótipo do HPV-58 (número de acesso: D90400), disponível no GenBank.

As ampliações foram realizadas em um volume final de 50µL, contendo 20ng de cada plasmídeo, 60mM de Tris-SO₄ (pH=8,9), 18mM de (NH₄)₂SO₄, 5mM de MgSO₄, 300µM de cada dNTP, 2U de *Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen, Califórnia, EUA) e 0,3µM dos iniciadores. Inicialmente, foram realizados 25 ciclos de amplificação no termociclador MJ Research PTC-100 (GMI, Minnesota, EUA): 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de anelamento a 55°C e 7 minutos de alongamento a 68°C. O primeiro ciclo foi precedido por 30 segundos a 94°C e o último ciclo foi estendido por 10 minutos a 68°C. Os produtos de PCR obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio a 0,5% para verificação da qualidade do DNA.

Em seguida, 2µl do produto de reação foram transformados em bactérias *E. coli* DH-5α. Esta célula recirculariza o DNA linear mutado e a endonuclease *McrBC* bacteriana digere o DNA metilado, deixando apenas o produto mutado não metilado. Uma colônia para cada amostra foi crescida em meio 2xYT contendo ampicilina (100µg/ml) a 37°C por 12 horas, sob agitação vigorosa. Seguiu-se a extração do DNA dos vetores retrovirais utilizando-se o *kit WizardTM Plus SV minipreps DNA Purification System* (Promega, Madison, EUA) seguindo instruções do fabricante.

4.8.6. Sequenciamento dos plasmídios

Todos os DNA extraídos foram submetidos ao sequenciamento pelo método desenvolvido por Sanger *et al.* (1977) empregando-se o kit *DYEnamicTM ET Terminator Cycle Sequencing Premix kit* (Pharmacia, Califórnia, EUA) em um sequenciador automático ABI PRISMTM 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer, Massachusetts, EUA). Para se obter a sequência completa do fragmento inserido no

vetor, foram utilizados para o seqüenciamento iniciadores complementares ao vetor pGL3-Basic (pGL5: 5'-TAGCAAATAGGCTGTCCC-3' e pGL3: 3'TATGTTTTTGGCGTCTTC5').

4.8.7. Isolamento do DNA dos vetores recombinantes em larga escala (Maxi-preparação)

O DNA dos vetores recombinantes contendo a LCR dos três diferentes variantes moleculares e a sequência protótipo de HPV-58, além das duas construções mutantes obtidas foi isolado por maxi-preparação de acordo com Sambrook e Russel (2001). Inicialmente foi feito um esfregaço em placa de L.B.-agar 1,5% (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl) contendo ampicilina a 100µg/ml de cada um dos crescidos bacterianos contendo os vetores construídos. Em seguida, uma colônia de cada vetor recombinante foi inoculada em 30ml de meio de cultura *Terrific Broth* (12g de triptona, 24g de extrato de levedura, 4ml de glicerol 89%, 100ml de solução KH₂PO₄ 0,17M e K₂HPO₄ 0,72M para 1 litro de solução) acrescido de ampicilina a 100µg/ml, e crescido a 37°C, a 240 rpm até que a D.O.₆₀₀ medida fosse 0,6. Nesse momento, 25ml de cada cultura citada foi incubada em 500ml de meio de cultura *Terrific Broth* acrescido de ampicilina a 100µg/ml por mais 12-16 horas, a 37°C, 240 rpm, em frascos para cultura bacteriana com capacidade de 2 litros. A solução foi então centrifugada a 3000 rpm, por 15 minutos, a 4°C, sendo, em seguida descartado o sobrenadante. Cada *pellet* foi ressuspendido em 200ml de STE gelado (Tris-HCl 10mM, pH=8, NaCl 0,1M, EDTA 1mM), e centrifugado a 3000 rpm, durante 15 minutos, a 4°C, e novamente o sobrenadante foi descartado. Cada *pellet* foi, então, ressuspendido em 18ml de solução de ressusensão (glicose 50mM, Tris-HCl 25mM, pH=8, EDTA 10mM). Foram em seguida adicionados 2ml de lizozima a 10mg/ml, e 20ml de solução de lise (NaOH 0,2N, SDS 1%), e após mistura por inversão, foi incubado a temperatura ambiente por 7 minutos. Foram então adicionados 20ml de solução de neutralização (acetato de potássio 3M, 11,5ml de ácido acético glacial para 100ml de solução), e após mistura por inversão e incubação em gelo por 10 minutos, foi centrifugado a 5000 rpm por 40 minutos, a 4°C. Posteriormente o sobrenadante foi vertido em uma proveta e foi adicionado 0,6 vezes do volume medido de isopropanol, misturado bem e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Seguiu-se uma centrifugação a 5000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente; o sobrenadante foi descartado, o *pellet* lavado com

etanol 70%, e secado sobre papel toalha. Finalmente, o *pellet* foi ressuspenso em 3ml de tampão T.E., pH=8. Todo o procedimento foi realizado utilizando-se uma centrífuga *Sorvall*[®] *RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge* com um rotor *Sorvall*[®] *H1000B*.

4.8.8. Purificação do DNA extraído por gradiente de densidade

Após a extração por maxi-preparação, os DNA dos vetores recombinantes contendo a LCR dos três variantes moleculares e da sequência protótipo de HPV-58, além dos dois mutantes construídos, foram purificados por gradiente de centrifugação contínuo de cloreto de cério de acordo com Sambrook e Russel (2001). Para tanto, os *pellets* dissolvidos em tampão T.E. foram pesados e para cada grama de solução foi adicionado 1,01g de CsCl sólido (Invitrogen, Califórnia, EUA). Após a dissolução completa do sal na solução tampão-DNA, foram adicionados 100µl de brometo de etídio 10mg/ml para cada 5g de solução de DNA original. As amostras foram então centrifugadas na centrífuga *Sorvall*[®] *RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge* utilizando-se um rotor *Sorvall*[®] *H1000B*, a 3000 rpm, por 5 minutos, a temperatura ambiente. Utilizando-se uma seringa descartável, a solução vermelha foi transferida para um tubo de ultracentrifugação (*Ultra Clear*[™] *Tubes*, 16 x 76mm, Beckman), e os tubos foram preenchidos até aproximadamente 3cm da borda com solução de 1,01g de cloreto de cério por mililitro de tampão T.E. (pH=8), sendo o resto do tubo preenchido com óleo mineral (Nujol). Os tubos foram então fechados com as tampas apropriadas e centrifugados no rotor 50 Ti da ultracentrífuga *Beckman L8-M*, a 45000 rpm, a 20°C. Após 48 horas, em uma sala com pouca luz, a banda referente ao DNA dupla fita circular plasmidial foi removida utilizando-se uma agulha de 19G conectada a uma seringa de 5ml de capacidade. Essa solução contendo os DNA de interesse foi transferida para um tubo de polipropileno, e o brometo de etídio foi removido por sucessivos ciclos de adição de n-butanol saturado, mistura, centrifugação a 3000 rpm e retirada da fase orgânica, até que a solução contendo o DNA estivesse completamente transparente (aproximadamente 4 ciclos).

Com o objetivo de retirar o cloreto de cério das soluções de DNA, estas foram dialisadas em 2 litros de tampão T.E. 1X utilizando-se os tubos para diálise *Prepared Dialysis Tubing* (BRL), por 20 horas, durante as quais o tampão T.E. foi trocado por 3 vezes. A solução com DNA foi então removida do tubo de diálise e precipitada por 12 horas a -70°C, com 2,5 volumes de etanol 100% e 0,1 volumes de acetato de sódio 3M.

Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12.000rpm, a 4°C e por 30min. Os *pellets* de DNA foram lavados com etanol 95%, repetindo-se a etapa de centrifugação nas mesmas condições, e, então, foram ressuspensos em 3ml de água destilada e deionizada. Posteriormente, os DNA foram novamente sequenciados, e a D.O.₂₆₀ foi medida para estimativa da concentração da solução.

4.8.9. Cultura celular da linhagem C33

As células C33 (queratinócitos derivados de carcinoma de colo de útero HPV negativo e p53 mutado) (ATCC n° HTB-31) foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Invitrogen, Califórnia, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), ou meio D10. As células foram mantidas em estufa úmida, a 37°C, e com 5% de CO₂. Para o congelamento, aproximadamente 10⁶ células foram congeladas em 1ml de meio de cultura D10 acrescido de SFB 10% e dimetilsulfóxido 10% (DMSO, Sigma Aldrich, Missouri, EUA).

4.8.10. Transfecção da linhagem celular C33

Além dos vetores contendo a LCR dos variantes da sequência protótipo e das construções mutantes de HPV-58, também foram transfectados plasmídios contendo a sequência da LCR dos HPV-16 (número de acesso: K02718) e -18 (número de acesso: X05015) protótipo. As transfecções foram realizadas com o uso de lipofectaminaTM (Invitrogen, Califórnia, EUA) em placas de cultura de células de 10cm de diâmetro (Corning, Massachusetts, EUA). Inicialmente, 4x10⁶ células foram plaqueadas em 10ml de meio D10. As células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ por aproximadamente 24 horas. Misturam-se 4µg de cada vetor pGL3 recombinante a 1µg do vetor pCMV-βGal (McGregor e Caskey, 1989) em DMEM, volume final de 100µl, sendo o último vetor utilizado como controle interno da eficiência da transfecção. Todos os plasmídios foram transfectados em triplicata, em um total de no mínimo sete experimentos. Em outro tubo foram misturadas 50µl de lipofectamina (1mg/ml) a 50µl de DMEM por placa a ser transfectada. Essas misturas foram incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse período, 100µl da mistura contendo DNA dos vetores e DMEM foi misturada à 100µl da mistura contendo lipofectamina e DMEM; essa nova mistura foi incubada a temperatura ambiente por mais 15 minutos. As células foram lavadas com 5ml de DMEM. Em seguida, às misturas de lipofectamina e DNA

supracitadas foram adicionados 4,5ml de DMEM, e esta foi gotejada cuidadosamente sobre as células. As células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ por 6 horas, e o meio de transfecção foi substituído por 10ml de D10 por 48 horas. Como controle negativo foi transfectado o vetor pGL3 recombinante na ausência do vetor pCMV-βGal e vice-versa. Em uma placa não foi transfectado nenhum dos vetores, sendo somente adicionada a lipofectamina.

4.8.11. Ensaio de Luciferase e β-Galactosidase

Após 48 horas da transfecção, as células foram lavadas 2 vezes com 5ml de PBS 1X a temperatura ambiente. Em seguida, foi pingado sobre as placas 900μl de *Repórter Lysis Buffer* (Promega, Madison, EUA) e incubado por 15 minutos. Foi passado um *scraper* sobre as células e o lisado foi transferido para um tubo *ependorf*. Seguiu-se uma centrifugação a 12.000rpm por 1min e o sobrenadante foi transferido e utilizado nos ensaios, sendo depois armazenado a -70°C. A concentração de proteína extraída desta maneira foi medida por reação com o reagente de *Bradford* (Bio-Rad, Califórnia, EUA), e leitura a 595nm em um *microplate Benchmark* (Bio-Rad, Califórnia, EUA).

Para o ensaio de luciferase foi utilizado o *kit The Promega luciferase assay system* (Promega, Madison, EUA) conforme instruções do fabricante. Em resumo, 20μl do lisado foram adicionados a 50μl de *luciferase assay reagent* e as leituras de unidades relativas de luciferase foram feitas em um luminômetro *Monolight[®] 3010* (Analytical Luminescence Laboratory).

Para o ensaio de β-Galactosidase foi utilizado o *kit The Promega β-Galactosidase enzyme assay system* (Promega, Madison, EUA) conforme instruções do fabricante. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços. A 50μl do lisado foram adicionados 50μl de *Assay 2X Buffer*. A mistura foi incubada a 37°C até que fosse observada a coloração amarela na mistura. Em seguida a reação foi inativada por adição de 150μl de Na₂CO₃ 1M. A atividade relativa da enzima β-Galactosidase foi medida por leitura a 420nm em um *microplate Benchmark* (Bio-Rad, Califórnia, EUA).

4.8.12. Análise estatística

As atividades relativas de luciferase obtidas dos extratos de células transfectados com o HPV-16, -18 e os variantes moleculares e mutantes de HPV-58, foram normalizadas com os valores obtidos no ensaio de β-Galactosidase e *Bradford*.

Inicialmente, foi realizado o teste de homogeneidade de variâncias, e como observou-se que as médias não eram homogêneas, optou-se por utilizar o teste não-paramétrico *Wilcoxon Rank-Sum* para comparação das médias dos diferentes grupos. Um valor de p menor que 0,05 foi considerado como significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o sistema estatístico *R* (*R Development Core Team, 2007*).

5. Resultados

5.1. Caracterização das amostras

Foram analisadas as regiões genômicas LCR, E6 e L1 de amostras de HPV-31, -33, -35, -52 e -58 provenientes do Distrito Federal, cujas características estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5. Dados da análise citológica, idade das pacientes e co-infecção com diferentes tipos de HPV de amostras de HPV-31, -33, -35, -52 e -58 coletadas no Distrito Federal.

Tipo de HPV	Amostra	Análise Citológica*	Co-infecção**	Idade
HPV-31	Bsb-36	Normal	-	32
	Bsb-133	Normal	-	36
	Bsb-140	NICII	-	24
	Bsb-193	NICII	HPV-31 e -33	29
	Bsb-216	NICIII	-	37
	Bsb-227	NICIII	-	65
	Bsb-233	***	-	***
	Bsb-299	NICII	-	21
	Bsb-330	NICII	-	35
	Bsb-350	NICIII	-	27
	Bsb-358	NICIII	-	20
	Bsb-370	NICIII	-	37
HPV-33	Bsb-23	Normal	-	24
	Bsb-24	NICII	HPV-33 e -66	29
	Bsb-31	HPV	-	53
	Bsb-98	NICIII	HPV-33, -16 e -39	25
	Bsb-193	NICII	HPV-33 e -31	29
	Bsb-369	HPV	-	29
	Bsb-404	HPV	HPV-33, -66 e -61	20
HPV-35	Bsb-56	ASCUS	-	24
	Bsb-59	NICIII	-	27
	Bsb-74	HPV	-	44
	Bsb-82	Normal	HPV-35 e -18	36
	Bsb-121	NICI	-	24
	Bsb-185	NICIII	HPV-35 e -58	53
HPV-52	Bsb-15	Normal	-	47
	Bsb-20	HPV	HPV-52 e -11	36
	Bsb-86	HPV	-	25
	Bsb-406	HPV	-	55
HPV-58	Bsb-93	NICI	-	26
	Bsb-128	HPV	HPV-58 e -53	28
	Bsb-185	NICIII	HPV-58 e -35	53
	Bsb-204	HPV	-	39
	Bsb-271	NICIII	-	34
	Bsb-295	CAESCA	-	57
	Bsb-329	NICIII	-	35
	Bsb-367	NICIII	-	33

* HPV: Efeito citopático compatível com infecção por HPV; ASCUS: Células atípicas de significado indeterminado; NIC I: Neoplasia intraepitelial de grau I; NIC II: Neoplasia intraepitelial de grau II; NIC III: Neoplasia intraepitelial de grau III; CAESCA: carcinoma escamoso. ** Infecção por mais de um tipo de HPV em uma mesma amostra. O hífen indica infecção por um único tipo viral. *** Dados indisponíveis.

A maioria das amostras analisadas foi obtida a partir de lesões cervicais, sendo que algumas apresentavam co-infecção por mais de um tipo viral. Apenas uma parte do total de amostras pode ser analisada nas três regiões genômicas, LCR, E6 e L1, devido à quantidades insuficientes de DNA ou falhas na amplificação do DNA.

5.2. Predição de sítios de ligação para fatores de transcrição na LCR

As Figuras 18 a 22, mostram o mapeamento dos potenciais sítios de ligação de fatores de transcrição na LCR, gerado pelo programa MATCH™, utilizando-se as sequências protótipo para cada tipo de HPV. Foram analisados sítios de ligação previamente observados nas LCR dos HPV-16 e -18 e cujas matrizes estavam disponíveis no programa TRANSFAC®.

As LCR dos HPV-31, -33 e -52 apresentaram quatro sítios de ligação para a proteína viral E2, permitindo a divisão da LCR em três segmentos distintos: 5', *enhancer* e 3' (O'Connor *et al.*, 1995). No entanto, as sequências da LCR dos HPV-35 e -58 apresentaram três e cinco sítios, respectivamente.

Em relação aos sítios de ligação para fatores transcricionais celulares, de maneira geral, foram observadas semelhanças entre a composição da LCR dos tipos analisados, incluindo um grande número de sítios de reconhecimento para os fatores repressores da transcrição viral YY-1 e C/EBP, e para Oct-1, um ativador transcricional. Por outro lado, foram observadas diferenças, como a ausência dos sítios de ligação para Sp-1 e AP-1 nas LCR dos HPV-33 e -31, respectivamente, além da ausência do TATA-box na LCR dos HPV-33 e -52. O elemento de resposta a glicocorticóide (GRE) foi observado apenas na LCR do HPV-52 e o sítio de ligação para cMyc/cMax não foi detectado nas LCR dos tipos virais analisados.

```

                                     <-----YY1
tggatgtgatgtaatacatgtgtctgtatgtgtatgtgcttgtgctgtattgtatatgtgtgTgtttgtgtttatatatggatatatgtatgtttatgtatgcgtgtgtacttgatat 7186
-----YY1
                                     ----->OCT1
                                     <-----YY1
atgtatagtatgtttatgtgtgtatgtatgctatgtatgttaataaatatgtgtataacctgtgtgtgtgtgtatgtttgctctatatacacacctattagtaacatactattactatttta 7306
----->YY1
                                     ----->YY1
                                     <-----OCT1
                                     -----CEBPB
taaactattgttcctacttgttcctacttgttcctgctcctcccaatagtcatgtacttatttctgcctataatttaggtgtcacgccatagtaaaagttgtacacccggtcggtttttt 7426
----->YY1
-----OCT1
----->CEBPB
-----CEBPB
                                     ----->E2
                                     -----E2
gcaactaaagctactccattttgatgtttatgagccatttttaaacctaacggttttcggttgcattgttttaaacatgctagtacaactatgctgatgcagtagttctgcggtttttgg 7546
-----NF1
-----NF1
-----NF1
                                     ----->YY1
                                     <-----SP1
                                     -----OCT1
tttctgaatactagtttttgcacacattctggcttgtagtttctgcctaacacaccttgccaacatataatccagtcacactttgcaattatactatgaatcatgtttgtttaaacac 7666
----->YY1
----->YY1
                                     -----OCT1
aactgtagttcaactatgtgtcatgcacatatattatattatcctacacaccttaaactgcttttaggcacatattttgtagattatctatatccttgattgcagtgctggcttttgcac 7786
-----OCT1
----->YY1
                                     ----->YY1
                                     -----OCT1
                                     -----OCT1
                                     ----->E2
                                     -----E2
atgtttaaactgccaagggtgtgtcatgcattataaataagttgtatgttactcatataattaattgcatataggattacaccggttttcggttacagttttacaagcaattgttctttt 7906
-----TATA
----->TATA
                                     ----->CEBPB
                                     -----CEBPB
                                     ----->E2
                                     -----E2
                                     ----->E2
                                     -----E2
tatacttaataataataatcttagtataaaaaagtagggagtgaccgaaagtggggaaccgaaacggttggtatataaagcacatagtatgttggcaaacctacagacgcc 107

```

Figura 18. Mapeamento de potenciais sítios de ligação de fatores de transcrição na LCR do HPV-31 protótipo. Em azul estão descritos os nomes dos fatores de transcrição sendo a extensão de cada sítio indicada por hífens que demarcam a localização do mesmo na sequência de nucleotídeos da LCR abaixo. A direção da seta indica o sentido da fita de DNA na qual cada fator possivelmente se liga, sendo que o símbolo -> indica o sentido 5'-3' e <-, o sentido 3'-5'.

```

----->CEBPB
<-----CEBPB
cactttgtgtaattgtgttatgttggttgtttgtctgtctatgtactttgtgtggttggttgttggttgtttgtttttgtgtatgtgttacaatgtatgttatgttattgttact 7213
----->YY1
<-----YY1
-----OCT1
gtgtttgtttatgtgtacttgtttgtgtgcatgttctatgtactttgtcagtttctgtttgtgtatgttaataaaacattgtgtgtatttggtaaactatttgtatgtatgttattgt 7333
----->CEBPB
<-----YY1
-----YY1
-----YY1
----->YY1
----->CEBPB
atatgggtgtacctatatgagtaaggagttgtattgcttgccctaccctgcattgcaatgtacctacctttatttccctatatattttagtagtacctacatgttttagtattgctttacctttt 7453
----->YY1
----->YY1
----->NF1
<-----E2
----->E2
-----OCT1
gacatactagtgtccatattgtacaatttctccattttgtatgcctaaccgttttcggttacttggcatacataccctatgacattggcagaacagttaatccttttctttctctgcact 7573
----->CEBPB
----->CEBPB
<-----OCT1
----->NF1
----->AP1
----->YY1
----->YY1
gtgtttgtctgtacttgtctgcatggcatacataccctatgacattggcagaacagttaatccttttctttctctgcactgtgtttgtctgtacttggctgcatgactcatatatacatgc 7693
----->OCT1
----->YY1
----->NF1
----->CEBPB
----->CEBPB
----->AP1
----->YY1
----->NF1
----->OCT1
----YY1
----->CEBPB
----->CEBPB
----->NF1
----->OCT1
agtgcaattgcaaaataacttaattgtactaataatgtttacacatgcttttaggcacatattttactttactttcaaaccttaagtgcagttttggcttacacaattgctttgtatgcaa 7813
<-----AP1
<-----E2
----->OCT1
--NF1
----->YY1
----->YY1
actatgccttgtaaaagtgtgagtcactacctgtttattaccaggtgtggactaacggttttaggtcatattggctcatttataatcttttatataatagtaaactataatgccaagttttaa 24
----->E2
----->YY1
<-----E2
<-----E2
----->E2
----->YY1
aaaagtaggggtgtaaccgaaagcggttcaaccgaaaacggtgcatatataaaagcaaacattttgcagtaaggtagtgcacgact 108

```

Figura 19. Mapeamento de potenciais sítios de ligação de fatores de transcrição na LCR do HPV-33 protótipo. Em azul estão descritos os nomes dos fatores de transcrição sendo a extensão de cada sítio de ligação indicada por hífens que demarcam a localização do mesmo na sequência de nucleotídeos da LCR abaixo. A direção da seta indica o sentido da fita de DNA na qual cada fator possivelmente se liga, sendo que o símbolo -> indica o sentido 5'-3' e <- o sentido 3'-5'.

```

                                                    <-----YY1
                                                    <-----...CEBPB
                                                    -----...CEBPB
tgtgtaaagtgtatgcatgtatactgtgtgttatgtggttagtgcttgtatataatattatgtgttggtgctgctgttgtgttgatgacatggcgtgtaaagtgtgtataatattgtgc 7229
<-----OCT1
----CEBPB          <-----OCT1
---->CEBPB
aatgtgttgtagctgggtgttttttgtatgtatgttgttgtatgtatgtcagtagcaataaaagtgtgtgtgtttataattaactgtattgttgtatgactatgggtgcacca 7349
----->YY1
<-----CEBPB          <-----OCT1
----->CEBPB          <-----E2
<-----CEBPB          ----->E2
tatgacttacataattacagtagcgtatatgttgtatataacaattctacctccattttgtgtgttagtgctcctttacattacctttcaaccgatttcggttggctgttggcaagcttt 7469
<-----NF1          <-----NF1
--->NF1          ----->NF1
atatgttttttacaaaaacattcctacctcagcagaacacttaatccttgtgttctgatataatattgtttgccactttataatggcttttgccaatctttaaacttgattcatcttgc 7589
-->YY1          ----->YY1          <-----OCT1
<-----AP1          <-----OCT1          <-----CEBPB
----->YY1
<-----OCT1
agtattagtcattttcacttgggtccaccacacttgtaaacacttgtaaacagtgttttaggcacatatttttgcatttctaagggtttaattgcacacttggtttacatat 7709
--OCT1          <-----NF1          ----->OCT1
----->YY1          <-----SP1          <-----YY1          <-----YY1
<-----NF1          <-----YY1          <-----OCT1
----->OCT1
tatgtgtgtttgccaacaccacctacacatcctgccaaactttaagttaaaacatgcatgtaaaacattactcactgtattacacattggttatatgcacacaggtgtgtccaaccgattt 7829
-----OCT1          ----->TATA          <-----E2
----->E2
<-----E2
----->E2
----->YY1
----->TATA
ggattacagttttataagcatttcttttattatagttagtaacaattatccctataaaaaaaaaacagggagtgaccgaaaacggtcgtagcggaaaacggttgccataaaagcagaagtgc 70
acaaaaagcagaagtggacagacattgtaagggtcggt 109

```

Figura 20. Mapeamento de potenciais sítios de ligação de fatores de transcrição na LCR do HPV-35 protótipo. Em azul estão descritos os nomes dos fatores de transcrição sendo a extensão de cada sítio indicada por hífens que demarcam a localização do mesmo na sequência de nucleotídeos da LCR abaixo. A direção da seta indica o sentido da fita de DNA na qual cada fator possivelmente se liga, sendo que o símbolo -> indica o sentido 5'-3' e <- o sentido 3'-5'.

```

----->CEBPB          ----->OCT1          <-----CEBPB          -----...YY1
<-----CEBPB          ----->YY1          ----->YY1          <-----...OCT1
ccattgtctgttggaattgtctgtgcatgtatgtggtgtatgtcaaacacagggttaaaggtaaccattgttgttatgtaattgtttgtgtgtactgtgtgtttgcatgt 7274
----->YY1          <-----AP1          ----->CEBPB
--OCT1
----->YY1
tatgtatgtgtgcatgtttgttattgtcagttcctgtatgtatgtttgtgtatgtattaataaagtactgtattactaaactatttatagtagtcttatgttatgttatggtt 7394
<-----SP1          ----->YY1
gcaccacatgagtaacaatacagttgctcctaattcattgcctcctgcctaccctgtgtccctgcctaccctgtgtcctactttgttacactactaattagccttatactctcc 7514
----->YY1          ----->E2          ----->NF1
----->YY1          <-----E2          ----->CEBPB
----->YY1
atthttgtaccattttgtactatccaccattttaaatcctaaccgaattcggttggctctggcacaactttggtgtccttggcacagtaacaactatthtttatataagtttcagcaaact 7634
<-----SP1          ----->AP1          ----->CEBPB
----->AP1          ----->CEBPB
----->YY1
gcttaatcctttggtttcctgcagtcactggctctacactgtttgtcccgcctaaactgacttcttgctgactcacaggtcctgcagtcagctaaacaatacattgcctaacattgcat 7754
----->YY1          ----->CEBPB          ----->YY1
<-----YY1
----->YY1
gttttaaactgcttttaggcacatattttatttaaactttcaatgcactaattacagtggttgcttacacaagtacatcctacgccaatatgtcttgtaaacatgattaataactgtt 7874
<-----E2          ----->E2
----->E2          ----->E2
----->E2
----->E2
actcaccaggtgtgcaactacacgaccggttacggttacccacacaccactttttttataattataaattataatcttatactagtaaaaaatagggtgtaaccgaaaacggtcag 52
<-----GRE
----->E2
----->E2
accgaaaccgggtgtatatatagaaacacagtgtagctaacgcacggcc 101

```

Figura 21. Mapeamento de potenciais sítios de ligação de fatores de transcrição na LCR do HPV-52 protótipo. Em azul estão descritos os nomes dos fatores de transcrição sendo a extensão de cada sítio indicada por hífens que demarcam a localização do mesmo na sequência de nucleotídeos da LCR abaixo. A direção da seta indica o sentido da fita de DNA na qual cada fator possivelmente se liga, sendo que o símbolo -> indica o sentido 5'-3' e <- o sentido 3'-5'.



Figura 22. Mapeamento de potenciais sítios de ligação de fatores de transcrição na LCR do HPV-58 protótipo. Em azul estão descritos os nomes dos fatores de transcrição sendo a extensão de cada sítio indicada por hífens que demarcam a localização do mesmo na sequência de nucleotídeos da LCR abaixo. A direção da seta indica o sentido da fita de DNA na qual cada fator possivelmente se liga, sendo que o símbolo -> indica o sentido 5'-3' e <-, o sentido 3'-5'.

de L1 de dez isolados de HPV-31, foram detectadas seis variações nucleotídicas já descritas na literatura entre os quatro diferentes variantes moleculares detectados.

A análise filogenética da LCR do HPV-31 foi realizada baseada na sequência de um fragmento de 503pb de 79 isolados, dos quais doze eram oriundos do Distrito Federal e as demais sequências foram obtidas no banco genômico GenBank, depositadas por Calleja-Macias *et al.* (2004). Dez isolados do Distrito Federal ficaram próximos da sequência protótipo do HPV-31, mas em um ramo com valor de *bootstrap* abaixo de 50%. Isso também foi observado com os isolados Bsb-36 e Bsb-216 que agruparam em um ramo com valor de *bootstrap* baixo, porém, distinto de onde a sequência protótipo do HPV-31 se localizou (Figura 24).

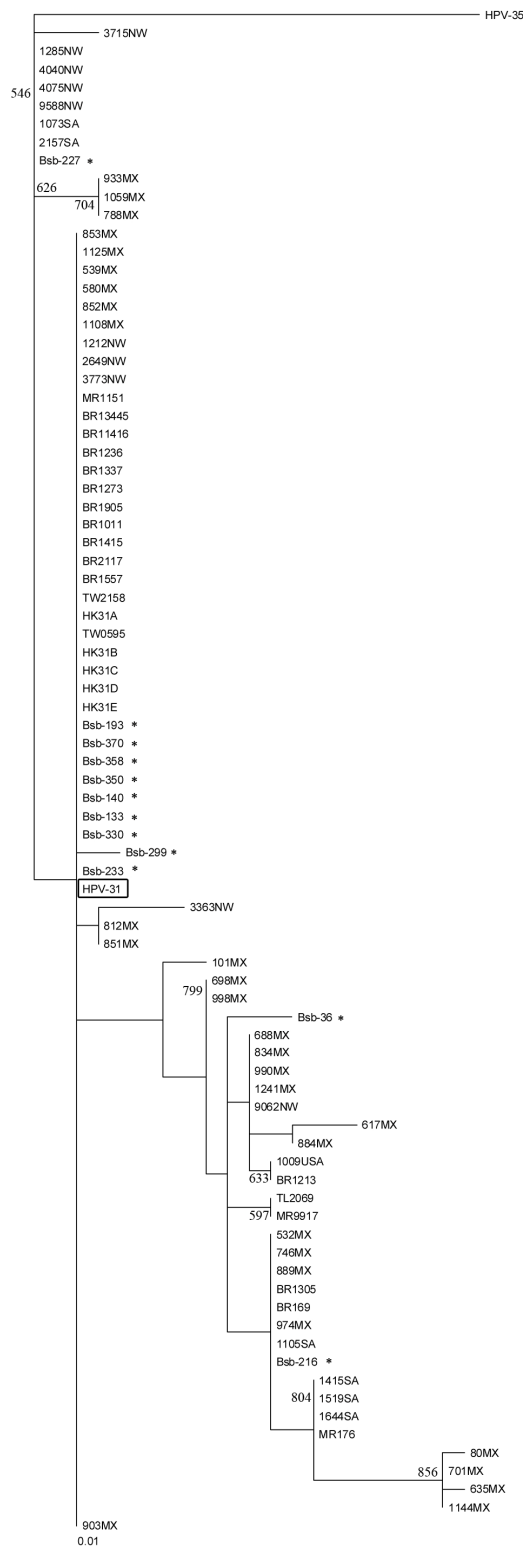


Figura 24. Análise filogenética do HPV-31. Em adição às amostras analisadas neste estudo (amostras marcadas com asteriscos para facilitar a localização) foram utilizadas amostras descritas por Calleja-Macias *et al.* (2004). As siglas que antecedem o número das amostras indicam a procedência geográfica: São Paulo, Brasil (BR); Hong Kong (HK); Monte Rei, México (MX); Cidade do Cabo, África do Sul (SA); Estados Unidos (USA); Marrocos (MR); Noruega (NW); Mali (ML); Timor-Leste (TL); Taipei, Taiwan (TW). Árvore de Máxima Parsimônia enraizada com o HPV-35 como grupo externo. Os valores nos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* calculados pelo método UPGMA e algoritmo LogDet e 1000 réplicas. São mostrados valores de *bootstrap* acima de 50%. O valor da barra de escala no canto esquerdo inferior representa a distância genética em substituições por nucleotídeo do fragmento analisado. A sequência do HPV-31 protótipo está destacada por um retângulo.

Uma vez que as sequências da LCR de HPV-33 descritas em outros estudos, até o momento, não estão disponíveis no GenBank, a análise filogenética deste tipo viral foi realizada baseada nas sequências de um fragmento do gene L1 de cinco isolados de HPV-33 do Distrito Federal, além de sequências de L1 depositadas no GenBank por Stewart *et al.* (1996) (Figura 26). No total, foram utilizadas sequências de 449pb de 9 isolados de HPV-33. Na árvore filogenética construída, não foram observados agrupamentos com valor de *bootstrap* significativo.

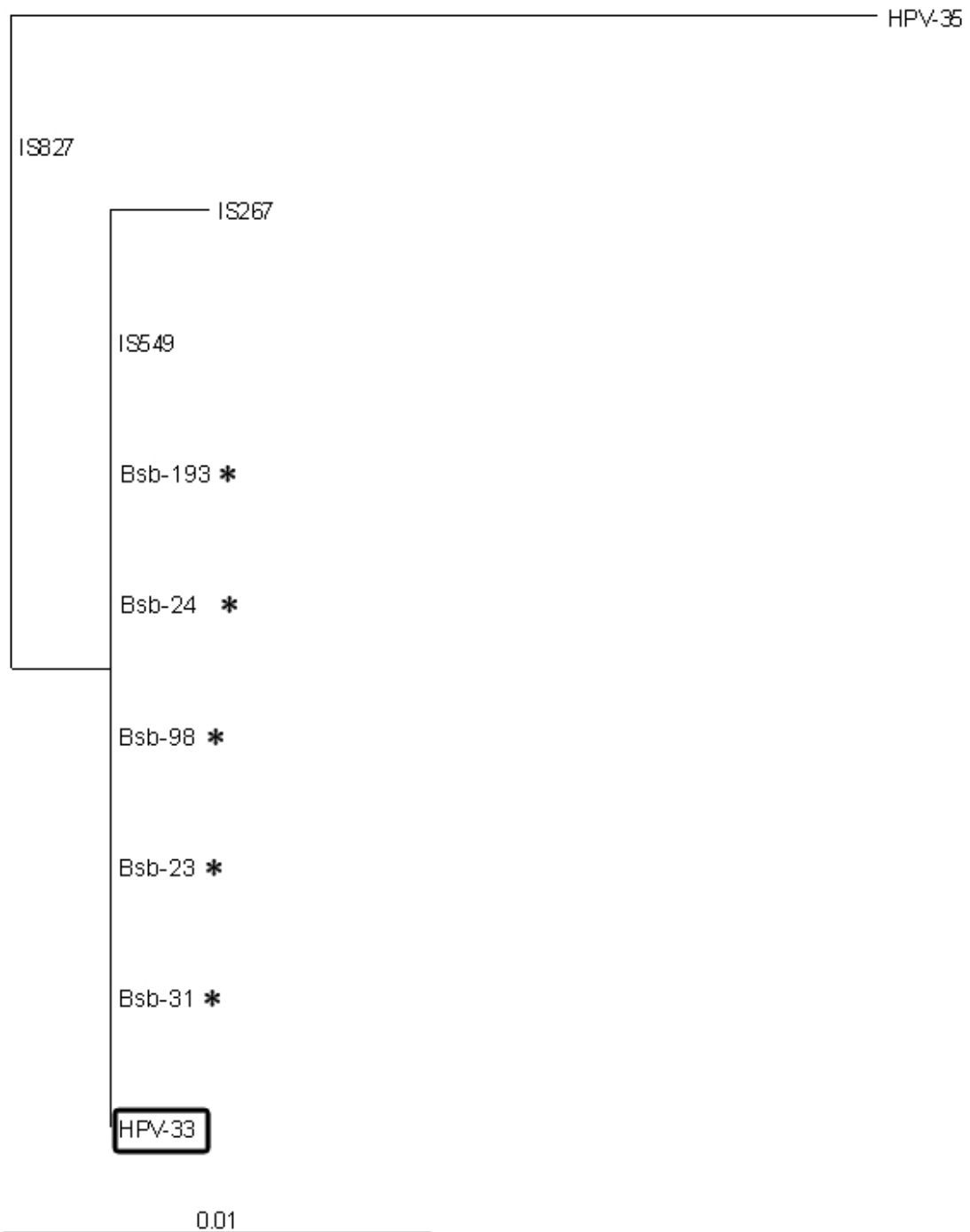


Figura 26. Análise filogenética de L1 do HPV-33. Em adição às amostras analisadas neste estudo (amostras marcadas com asterisco para facilitar a localização) foram utilizadas amostras analisadas por Stewart *et al.* (1996). Árvore de Máxima Parsimônia enraizada com o HPV-35 como grupo externo. Os valores nos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* calculados pelo método UPGMA e algoritmo LogDet e 1000 réplicas. São mostrados valores de *bootstrap* acima de 50%. O valor da barra de escala no canto esquerdo inferior representa a distância genética em substituições por nucleotídeo do fragmento analisado. A sequência do HPV-33 protótipo está destacada por um retângulo.

5.5. HPV-35

Nas quatro amostras de HPV-35 em que foi analisada a sequência da LCR, foram observados quatro variantes distintos compreendendo cinco variações nucleotídicas: três substituições pontuais, uma deleção pontual e uma inserção de 16pb. O isolado Bsb-121 apresentou a substituição de A para G na posição 7418 ainda não descrita na literatura. A variação de T para C na posição 7535 e a variação na posição 7758 de A para G se localizam sobrepostos a potenciais sítios de ligação dos fatores transcricionais celulares NF-1 e YY1, respectivamente. A inserção de 16pb, já descrita na literatura, foi detectada em dois isolados (Bsb-59 e Bsb-82), inserindo um potencial sítio de ligação a YY1 na LCR desses isolados (Figuras 27).

HPV-35	LCR					E6					L1	Número de amostras	
Isolados	7	7	7	7	7	1	1	1	2	3	3		6
4	4	4	5	7	1	1	1	2	3	3	6		
1	1	8	3	5	2	3	3	9	2	4	4		
2	8	0	5	8	7	1	6	5	6	1	2		
Ref		A	T	T	A	T	C	T	A	A	T	T	
Bsb-56	ND					C	A	C	T		C	ND	1
Bsb-59	I		D	C	G	C	A	C	T		C	A	1
Bsb-74				C	G		A		T			ND	1
Bsb-82	I		D	C	G	C	A	C	T		C	ND	1
Bsb-121*		G					A		T	G		ND	1
Bsb-185	ND					C	A	C	T		C	ND	1
	YY1			NF-1	YY1					I73V	W78R	S348T	

Figura 27. Variabilidade genética da LCR e dos genes E6 e L1 de isolados de HPV-35. Em cinza, nucleotídeos conservados em relação à sequência protótipo do HPV-35; hachurado, variações nucleotídicas previamente relatadas na literatura (Calleja-Macias *et al.*, 2004, 2005, Gagnon *et al.*, 2004; Hiller *et al.*, 2006) e em negrito, e em negrito, variações de nucleotídeos não descritas na literatura e substituições de aminoácidos não-conservativas. O novo variante molecular detectado neste estudo está marcado com asterisco. Ref: sequência protótipo do HPV-35; D: Deleção de T, I: Inserção de 16pb, ND: sequência não determinada, I: isoleucina, V: valina, W: triptofano, R: arginina, S: Serina, T: treonina.

Na sequência do gene E6, foram observadas seis variações nucleotídicas pontuais já descritas por Calleja-Macias *et al.* (2005), sendo detectados três variantes distintos entre as seis amostras de HPV-35 analisadas. A substituição de T para C na posição 341 foi detectada em quatro isolados, e leva à substituição de aminoácido não conservativa de triptofano (W) para asparagina (R) no códon 78 (Figura 27).

Foi possível analisar a sequência do fragmento do gene L1 de apenas uma amostra (Bsb-59), na qual foi observada uma substituição nucleotídica de T para A na posição

6642, que resulta na substituição de aminoácido não conservativa de serina (S) para treonina (T) no códon 348 previamente descrita por Stewart *et al.* (1996) e Calleja-Macias *et al.* (2005) (Figura 27).

Para a realização da análise filogenética da LCR do HPV-35, foram utilizadas sequências de 653pb oriundos de 51 isolados. Destes, quatro eram provenientes do Distrito Federal e 47 foram obtidos do estudo desenvolvido por Calleja-Macias *et al.* (2004) envolvendo amostras de diferentes regiões do mundo (Figura 28).

Foi observada uma ramificação dicotômica na análise filogenética da sequência de um fragmento da LCR do HPV-35 com valores de *bootstrap* significativo. A dicotomia foi marcada pela presença ou ausência de um fragmento de 16pb entre as posições 7412 e 7413. No agrupamento A, todos os isolados apresentam o fragmento de 16pb e no agrupamento B, nenhum dos isolados apresentam essa inserção. Essa topologia também foi observada por Calleja-Macias *et al.* (2005).

Dentre as quatro amostras analisadas neste estudo, duas (Bsb-74 e Bsb-121) estão no agrupamento B, onde está localizada a sequência protótipo do HPV-35. O isolado Bsb-121 ficou mais próximo da sequência protótipo que o isolado Bsb-74, apesar do valor de *bootstrap* ter sido abaixo de 50%. Os isolados do Distrito Federal não formaram um aglomerado único, conforme esperado, uma vez que as sequências da LCR obtidas eram idênticas a outras já depositadas no GenBank, com exceção da amostra Bsb-121 que apresentou uma variação ainda não descrita na literatura (Figuras 27 e 28). Analogamente ao observado para os HPV-31 e -33 e também descrito por Calleja-Macias *et al.* (2005), a análise filogenética do HPV-35 não apresentou aglomerados étnicos ou geográficos específicos.

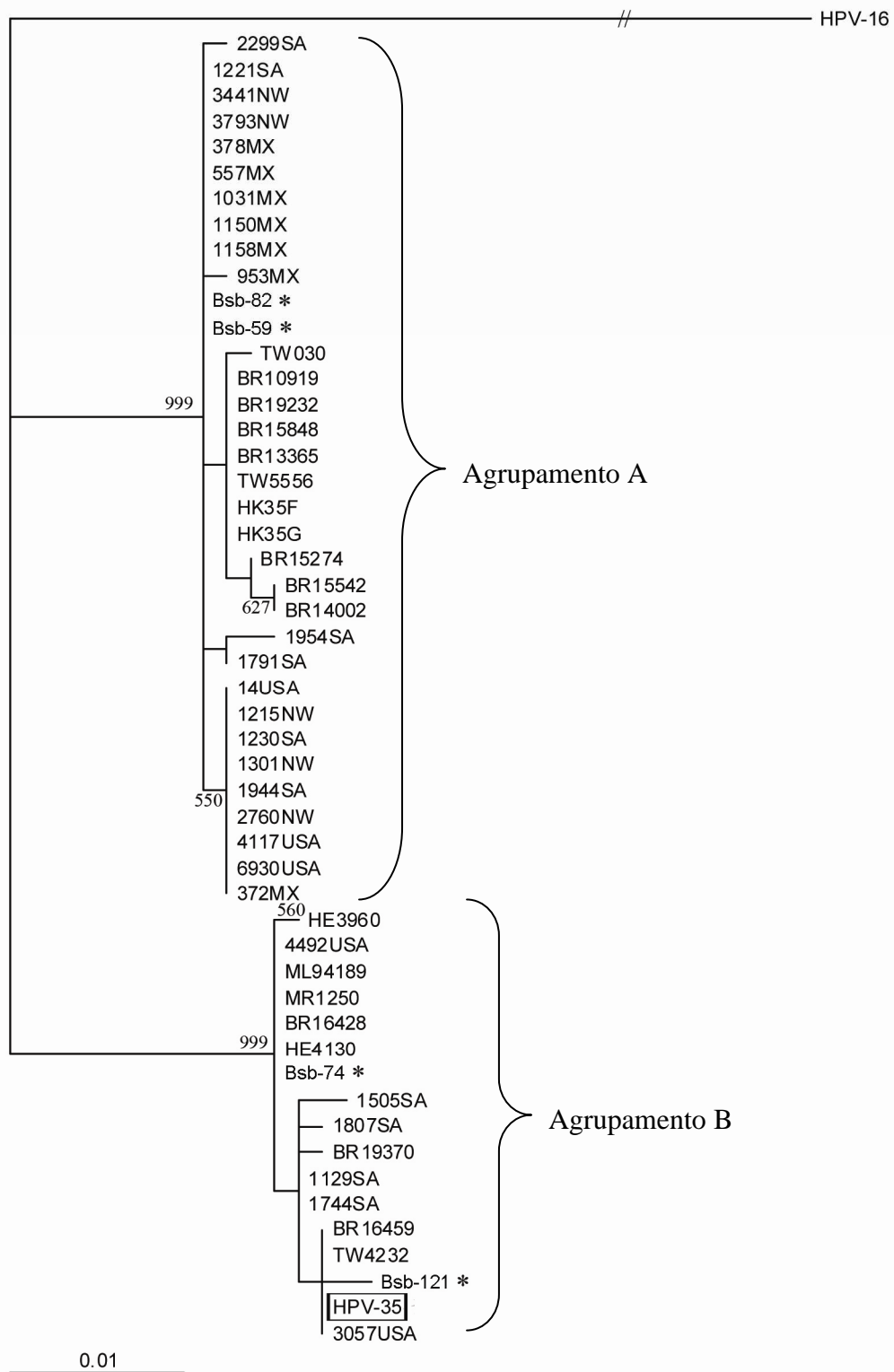


Figura 28. Análise filogenética do HPV-35. Em adição às amostras analisadas neste estudo (amostras marcadas com asterisco para facilitar a localização) foram utilizadas amostras do estudo de Calleja-Macias *et al.* (2005). As siglas que antecedem o número das amostras indicam a procedência geográfica: São Paulo, Brasil (BR); Hong Kong (HK); Monte Rei, México (MX); Cidade do Cabo, África do Sul (SA) e Estados Unidos (USA); Marrocos (MR); Noruega (NW); Heidelberg, Alemanha (HE); Taipei, Taiwan (TW). Nos agrupamentos A e B estão os isolados com ou sem a inserção de 16pb, respectivamente. Árvore de Máxima Parsimônia enraizada com o HPV-16 como grupo externo. Os valores nos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* calculados pelo método UPGMA e algoritmo LogDet e 1000 réplicas. São mostrados valores de *bootstrap* acima de 50%. O valor da barra de escala no canto esquerdo inferior representa a distância genética em substituições por nucleotídeo do fragmento analisado. A sequência protótipo de HPV-35 está destacada por um retângulo.

5.6. HPV-52

Entre todos os tipos virais analisados neste estudo, os variantes de HPV-52 foram os que apresentaram a maior variabilidade genética. Foram analisadas as sequências de quatro amostras de HPV-52, tendo sido detectados dois variantes compreendendo 23 variações nucleotídicas: 19 substituições pontuais, duas deleções e duas inserções. No estudo realizado por Calleja-Macias *et al.* (2005), 65 dos 66 isolados analisados apresentaram a deleção de 5pb entre as posições nucleotídicas 7387 e 7391 na LCR. Pelo exposto, o isolado protótipo original do HPV-52 foi sequenciado novamente a fim de verificar a presença, desta deleção. De acordo com os autores, um erro na análise da sequência da LCR protótipo resultou na presença destes 5pb no isolado protótipo. Essa deleção também foi detectada em todos os isolados do Distrito Federal analisados no presente estudo (Figuras 29)

Sete variações nucleotídicas, já descritas na literatura, estão localizadas sobrepostas a potenciais sítios de ligação a E2, C/EBP e AP-1. A inserção de 6pb entre as posições 7702 e 7703 no isolado Bsb-15 resulta na alteração da sequência do potencial sítio de ligação a AP-1, além de criar um possível sítio de ligação a Sp-1 na mesma localização. Adicionalmente, o isolado Bsb-15 apresentou nove variações na LCR ainda não descritas na literatura. Entre estas, as substituições nas posições 7207, e 7861 e 7865 se localizam sobrepostas a potenciais sítios para Oct-1 e E2, respectivamente (Figura 29).

A sequência do gene E6 do isolado Bsb-15 revelou quatro variações nucleotídicas silenciosas pontuais já descritas por Aho *et al.* (2003) e Calleja-Macias *et al.* (2005). Nos outros três isolados analisados, Bsb-20, Bsb-86 e Bsb-406, não foram observadas variações em relação à sequência protótipo do gene E6 (Figura 29).

classificação preliminar como um ramo Brasileiro. Outro ramo não pode ser classificado baseado em composição étnica ou geográfica, uma vez que é composto por amostras provenientes do Marrocos, Brasil e México. Todos os isolados coletados na Europa ficaram agrupados em um ramo juntamente com amostras de outras partes do mundo, levando à classificação de um ramo Europeu. Finalmente, o último ramo foi classificado como um ramo Asiático por ser composto quase na totalidade por amostras de origem asiática. Os isolados do Distrito Federal Bsb-20, Bsb-86 e Bsb-406 se agruparam no ramo Europeu, onde também está localizada a sequência protótipo do HPV-52 (Figura 30).

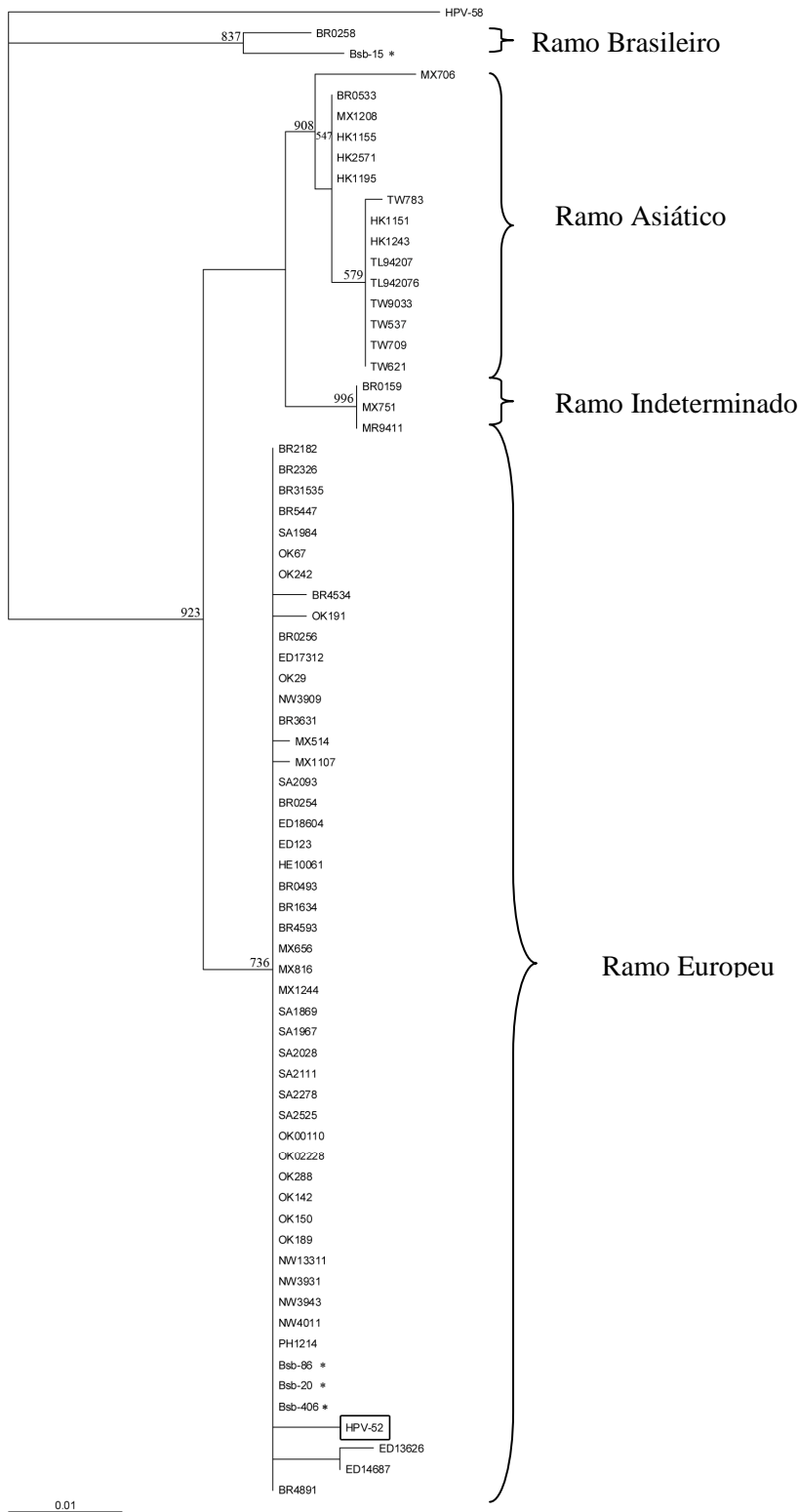


Figura 30. Análise filogenética do HPV-52. Em adição às amostras analisadas neste estudo (amostras marcadas com asterisco para facilitar a localização) foram utilizadas amostras do estudo de Calleja-Macias *et al.* (2005). As siglas que antecedem o número das amostras indicam a procedência geográfica: São Paulo, Brasil (BR); Hong Kong (HK); Monte Rei, México (MX); Edimburgo, Escócia (ED); Cidade do Cabo, África do Sul (SA) e Oklahoma, Estados Unidos (OK); Marrocos (MR); Noruega (NW); Heidelberg, Alemanha (HE); Filipinas (PH); Taipei, Taiwan (TW). Árvore de Máxima Parsimônia enraizada com o HPV-35 como grupo externo. Os valores nos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* calculados pelo método UPGMA e algoritmo LogDet e 1000 réplicas. São mostrados valores de *bootstrap* acima de 50%. O valor da barra de escala no canto esquerdo inferior representa a distância genética em substituições por nucleotídeo do fragmento analisado. A sequência protótipo do HPV-52 está destacada por um retângulo.

5.7. HPV-58

A análise da sequência da LCR de oito isolados de HPV-58 revelou três variantes compreendendo quatro variações nucleotídicas pontuais em relação à sequência protótipo. As substituições nas posições 7266 e 7714 foram detectadas em todos isolados de HPV-58 analisados. Esta última está localizada sobreposta a potenciais sítios de ligação aos fatores NF-1 e C/EBP. Adicionalmente, a variação de G para A na posição 7788 localiza-se sobreposto a um potencial sítio de ligação para E2. As substituições de C para G e C para T nas posições 7265 e 7266, respectivamente, ainda não estão descritas na literatura (Figuras 31).

HPV-58	LCR				E6	L1		Número de amostras
Isolados	7	7	7	7		6	6	
	2	2	7	7	3	6	7	
	6	6	1	8	0	4	2	
	5	6	4	8	7	1	7	
Ref	C	C	A	G	C	G	C	
Bsb-128	G	T	G		T	ND		1
Bsb-185	G	T	G		T	A		3
Bsb-295*		T	G	A	T	A		2
Bsb-329*		T	G		T	A		1
Bsb-367*	G	T	G		T	A	T	1
		NF-1/C/EBP		E2				

Figura 31. Variabilidade genética da LCR e dos genes E6 e L1 de isolados de HPV-58. Em cinza, nucleotídeos conservados em relação à sequência protótipo; hachurado, variações nucleotídicas previamente relatadas na literatura (Stewart *et al.*, 1996; Xin *et al.*, 2001; Calleja-Macias *et al.*, 2005) e em negrito, variações de nucleotídeos não descritas na literatura. Os novos variantes moleculares detectados neste estudo estão marcados com asteriscos. Ref: sequência protótipo do HPV-58; ND: sequência não determinada.

Em relação à análise da sequência do gene E6 das amostras de HPV-58, foi detectado o mesmo variante nos oito isolados analisados contendo uma substituição nucleotídica silenciosa de C para T na posição 307 previamente descrita por Xin *et al.* (2001) e Calleja-Macias *et al.* (2005) (Figura 31).

Sete isolados de HPV-58 tiveram a sequência de um fragmento do gene L1 analisada. Foram detectadas duas variações nucleotídicas silenciosas, sendo que a substituição de C para T na posição 6727 ainda não foi relatada na literatura (Figura 31).

A análise filogenética da LCR do HPV-58 foi realizada a partir de fragmentos de 461pb de 102 isolados, dos quais, oito isolados eram oriundos do Distrito Federal e as

demais sequências foram obtidas a partir do banco genômico GenBank, depositadas por Calleja-Macias *et al.* (2005). Os isolados Bsb-93 e Bsb-295 formaram um agrupamento isolado com *bootstrap* significativo, justificado pela presença de uma mutação na posição 7788, detectada apenas nesses dois isolados (Figura 32). Os demais isolados do Distrito Federal se agruparam com baixo valor de *bootstrap*, no ramo onde estão a maioria das amostras incluídas nesta análise filogenética. Não foram observados aglomerados étnicos ou geográficos específicos na análise filogenética do HPV-58.

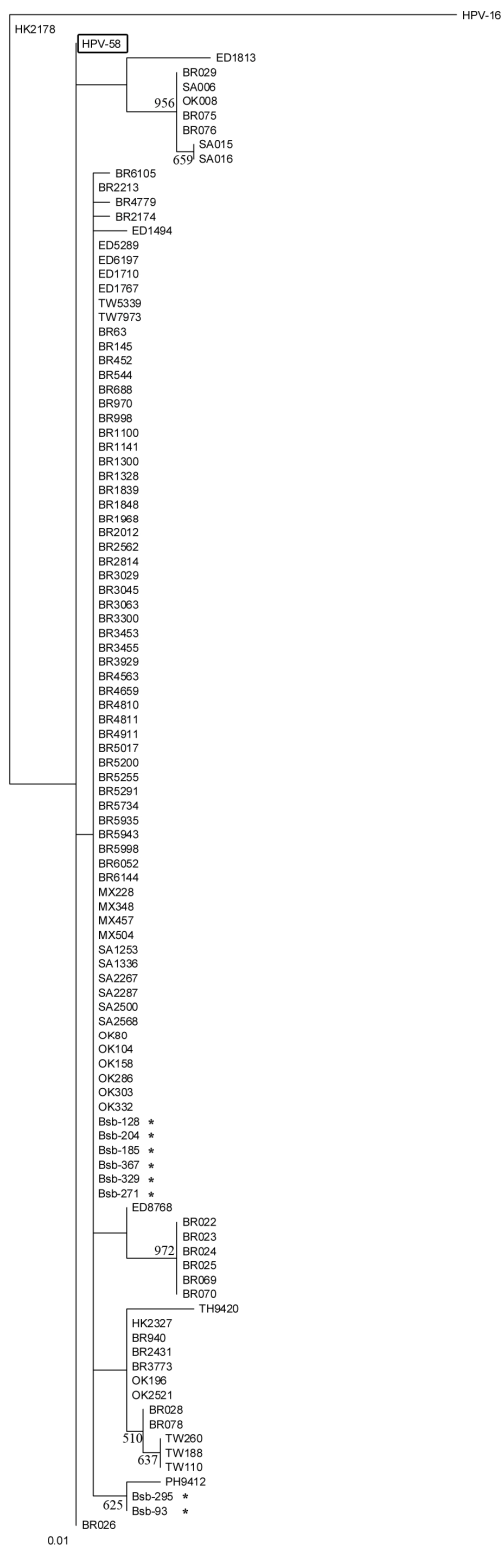


Figura 32. Análise filogenética do HPV-58. Em adição às amostras analisadas neste estudo (amostras marcadas com asterisco para facilitar a localização) foram incluídas amostras do estudo de Calleja-Macias *et al.* (2005). As siglas que antecedem o número das amostras indicam a procedência geográfica: São Paulo, Brasil (BR); Hong Kong (HK); Monte Rei, México (MX); Edimburgo, Escócia (ED); Cidade do Cabo, África do Sul (SA), Oklahoma, Estados Unidos (OK), Taipei, Taiwan (TW), Tailândia (TH) e Filipinas (PH). Árvore de Máxima Parsimônia enraizada com o HPV-16 como grupo externo. Os valores nos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* calculados pelo método UPGMA e algoritmo LogDet e 1000 réplicas. São mostrados valores de *bootstrap* acima de 50%. O valor da barra de escala no canto esquerdo inferior representa a distância genética em substituições por nucleotídeo do fragmento analisado. A sequência protótipo do HPV-58 está destacada por um retângulo.

5.8. Análise das distâncias genéticas intratípicas

A distância genética intratípica foi determinada pela comparação das sequências da LCR dos isolados de HPV-31, -35, -52 e -58 detectados no Distrito Federal com todas as sequências depositadas até o momento no banco de dados GenBank. Para a análise da distância genética do HPV-33, foram comparadas as sequências de um fragmento do gene L1 dos isolados do Distrito Federal com aquelas depositadas no GenBank por Stewart *et al.* (1996), uma vez que sequências da LCR de HPV-33 obtidas em outros estudos não estão disponíveis no banco genômico.

As máximas distâncias genéticas encontradas entre quaisquer duas sequências, incluindo a sequência protótipo de cada tipo viral, estão descritas na Tabela 6. A partir da análise da LCR, a máxima distância genética foi de 12 variações nucleotídicas de um fragmento de 504pb (2,38%) para o isolado Bsb-227 de HPV-31, seis variações de um fragmento de 664pb (0,90%) para o isolado Bsb-121 de HPV-35, e oito variações de um fragmento de 461pb (1,73%) para os isolados Bsb-93 e Bsb-295 de HPV-58. O isolado Bsb-15 de HPV-52 apresentou a maior distância genética: 23 variações de 797pb (3,03%) em relação à sequência da LCR do HPV-52 protótipo. Além disso, a máxima distância genética, entre os isolados de HPV-33, foi de quatro variações de um fragmento de L1 de 406pb (0,98%) para os isolados Bsb-23 e Bsb-31. No total, foram descritos 13 novos variantes em relação à respectiva sequência protótipo, cujas sequências estão apresentadas no Anexo II.

Tabela 6. Comparação do número de variações nucleotídicas relativas ao total de nucleotídeos sequenciados e máximas distâncias genéticas intratípicas entre os isolados de HPV-31, -33, -35, -52 e -58 detectados no Distrito Federal.

Tipo de HPV	Isolados	Máxima distância genética (%)	Número de amostras
HPV-31	Bsb-36	1,59	1
	Bsb-133	2,15	1
	Bsb-140	2,00	1
	Bsb-193	1,98	5
	Bsb-216	0,80	1
	Bsb-227	2,38	1
	Bsb-299	2,18	1
HPV-33	Bsb-23	0,98	2
	Bsb-24	0,74	5
HPV-35	Bsb-59	0,46	1
	Bsb-74	0,42	1
	Bsb-82	0,58	1
	Bsb-121	0,90	1
HPV-52	Bsb-15	3,03	1
	Bsb-20	2,05	3
HPV-58	Bsb-93	1,73	2
	Bsb-128	1,51	5
	Bsb-329	1,30	1

5.9. Análise da expressão do promotor de E6/E7 de variantes de HPV-58

A sequência completa da LCR de três variantes distintos de HPV-58 detectados no Distrito Federal foi clonada a montante do gene repórter luciferase, no vetor pGL3-Basic. A Figura 33 mostra as quatro variações nucleotídicas pontuais detectadas entre estas variantes naturais de HPV-58 (Bsb-295, Bsb-329 e Bsb-367). Além disso, a sequência da LCR do HPV-58 protótipo (HPV-58prot) também foi clonada no vetor pGL3-Basic.

Isolados	LCR			
	7	7	7	7
	2	2	7	7
	6	6	1	8
	5	6	4	8
Ref	C	C	A	G
Bsb-295		T	G	A
Bsb-329		T	G	
Bsb-367	G	T	G	
HPV-58prot				
HPV-58mut				A
Bsb-367mut	G	T	G	A

Figura 33. Variabilidade genética da LCR dos isolados de HPV-58. Em cinza, nucleotídeos sem alteração em relação à sequência protótipo.

As construções obtidas foram transfectadas em células C33, juntamente com o vetor pCMV- β gal, utilizado como controle da eficiência das transfecções. Também foram transfectados vetores recombinantes contendo a LCR completa dos isolados protótipo de HPV-16 e -18 previamente construídos por Sichero *et al.* (2005). Foram realizados ao menos sete experimentos nos quais os vetores recombinantes foram transfectados em triplicata. Os valores relativos de unidades de luminescência obtidos em cada experimento foram normalizados pelo conteúdo protéico e pela atividade da enzima β -galactosidase, e posteriormente comparados aos valores medidos para o HPV-16 protótipo, determinando-se, desta forma, razões relativas (Figura 34).

Isolados	Experimentos (razões relativas)								Média	Desvio padrão
	1	2	3	4	5	6	7	8		
HPV-16	1	1	1	1	1	1	1	1	1,00	0,00
HPV-18	7,15	7,49	9,38	9,74	7,73	3,25	4,07	2,90	6,97	2,70
Bsb-295	7,96	4,85	5,03	7,04	4,76	2,80	3,26	3,66	5,10	1,80
Bsb-329	0,49	0,47	0,45	0,87	0,54	0,19	0,41	0,63	0,49	0,19
Bsb-367	0,62	0,92	1,37	1,49	1,95	0,76	0,41	1,30	1,08	0,51
HPV-58 prot	-	1,20	1,82	1,21	1,25	0,68	0,54	1,53	1,12	0,45
HPV-58 mut	-	2,99	4,94	6,15	3,48	2,01	1,40	3,55	3,50	1,63
Bsb-367mut	-	0,06	0,02	0,03	0,04	0,02	0,01	0,03	0,03	0,02

Figura 34. Razões relativas de unidades de luminescência (RLU) detectadas entre os isolados de HPV-58, -16 e -18. Foram realizados no mínimo sete experimentos nos quais os vetores recombinantes foram transfectados em triplicata. Aos valores de RLU referente ao HPV-16 protótipo foi atribuído o valor 1. Os valores de RLU detectados nos demais isolados foram comparados àqueles obtidos para o HPV-16 em cada experimento. O hífen indica que no experimento 1 não foram analisadas as atividades transcricionais dos isolados indicados.

A Figura 35 mostra graficamente os resultados obtidos. Conforme esperado, o HPV-18 protótipo apresentou uma atividade transcricional cerca de sete vezes maior que a do HPV-16 protótipo (Sichero *et al.*, 2005). Pode-se observar que o HPV-58

protótipo e os variantes Bsb-329 e Bsb-367 de HPV-58 apresentaram atividade transcricional similar ao HPV-16. Por outro lado, o variante Bsb-295 apresentou uma atividade transcricional cinco vezes maior que o HPV-16 protótipo, e similar ao HPV-18 protótipo (Figuras 34 e 35). As atividades transcricionais obtidas pelo HPV-18 protótipo e pelo variante Bsb-295 não foram estatisticamente diferentes (Figura 36).

A análise das variações nucleotídicas detectadas indica que a única diferença na sequência da LCR entre os variantes Bsb-295 e Bsb-329 é a substituição na posição 7788. Desta forma, essa variação parece ser a responsável pelo aumento transcricional observado para o variante Bsb-295.

A fim de verificar a influência da variação na posição 7788 isoladamente sobre a atividade do promotor de E6/E7, foi construído, por meio da técnica de mutagênese sítio-dirigida, o mutante HPV-58mut contendo, na sequência da LCR do HPV-58 protótipo, apenas essa variação. Além disso, foi também construído o mutante Bsb-367mut que apresenta na sequência da LCR as quatro variações nucleotídicas detectadas entre os isolados de HPV-58 do Distrito Federal (Figura 33).

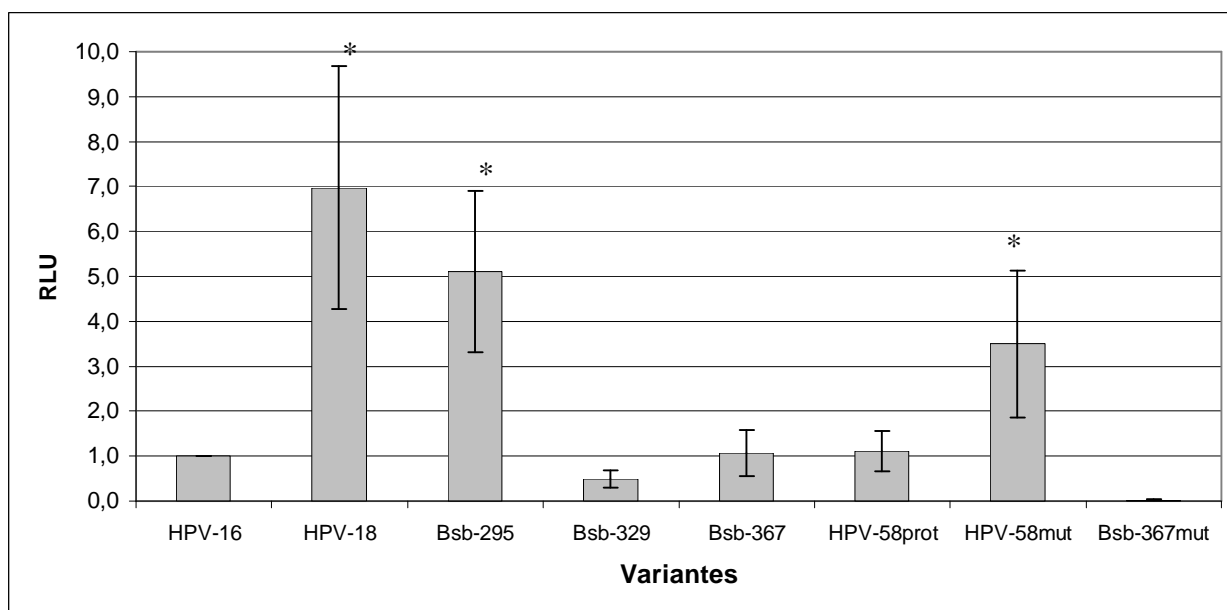


Figura 35. Unidades Relativas de Luminescência (RLU) detectadas entre os isolados de HPV-58, -16 e -18. As médias de RLU, obtidas a partir das razões de cada experimento realizado, foram plotadas juntamente com os respectivos desvios padrões. Os asteriscos indicam que os isolados indicados não foram estatisticamente diferentes entre si, mas foram estatisticamente diferentes em relação aos demais isolados ($p < 0,005$, IC: 95%).

A inserção da substituição na posição 7788 na sequência da LCR protótipo resultou no aumento da atividade transcricional em aproximadamente 3,2 vezes em relação ao HPV-58 protótipo (Figuras 34 e 35). As atividades transcricionais observadas

para o variante Bsb-295, o mutante HPV-58mut e o HPV-18 não foram estatisticamente diferentes, no entanto, eram estatisticamente distintas dos demais variantes analisados (Figura 36). Em conjunto esses dados indicam que a alteração na posição 7788 parece ser a principal causa do aumento da atividade transcricional observada para o variante Bsb-295.

Variantes	Valor de p - Teste de Wilcoxon						
	HPV-16	HPV-18	Bsb-295	Bsb-329	Bsb-367	HPV-58 prot	HPV-58 mut
HPV-16							
HPV-18	0,0004						
Bsb-295	0,0004	0,3282					
Bsb-329	0,0004	0,0001	0,0001				
Bsb-367	1,0000	0,0001	0,0001	0,0207			
HPV-58 prot	0,1489	0,0003	0,0003	0,005	0,955		
HPV-58 mut	0,0005	0,0540	0,1893	0,0003	0,0012	0,0023	
Bsb-367mut	0,0005	0,0010	0,0014	0,0014	0,0014	0,0021	0,0021

Figura 36. Análise estatística das médias de unidades relativas de luciferase (RLU). O resultado obtido foi gerado a partir do teste não paramétrico de Wilcoxon, por meio do sistema estatístico R. O intervalo de confiança considerado foi de 95%.

O mutante Bsb-367mut que apresenta todas as variações nucleotídicas detectadas no presente estudo apresentou uma atividade transcricional muito baixa indicando que a presença artificial das quatro variações parece inibir fortemente o promotor de E6/E7 de HPV-58.

6. Discussão

No mundo, o tipo de HPV mais prevalente é o HPV-16, detectado em aproximadamente 30 a 40% das lesões cervicais de alto grau. Entretanto, a prevalência dos outros tipos virais de alto risco varia entre os diferentes países e mesmo entre as regiões geográficas de um mesmo país. A distribuição dos genótipos do HPV no Brasil parece ser complexa, já que sua prevalência pode diferir significativamente mesmo entre cidades bem próximas (IARC, 2007). Portanto, os dados coletados em uma cidade ou município não podem ser generalizados para todo o país ou mesmo para uma região geográfica específica. A distribuição diferenciada dos tipos de HPV no mundo tem determinantes ainda desconhecidos.

Até o momento, poucos estudos foram conduzidos mundialmente com o intuito de analisar a variabilidade genética de tipos de alto risco menos prevalentes que os HPV-16 e -18. O estudo dos variantes moleculares dos diversos tipos de HPV em diferentes regiões geográficas é de grande importância para a caracterização de polimorfismos intratípicos específicos, além da análise da distribuição destes genótipos ao redor do mundo. Esses estudos podem fornecer evidências sobre a existência de diferenças biológicas na transmissibilidade e patogênese entre os variantes moleculares do HPV, além de contribuir para o desenvolvimento e utilização efetiva de vacinas.

Os diferentes tipos de HPV apresentam uma organização genômica similar, no entanto podem diferir nos níveis de expressão gênica. A transcrição dos genes virais é um processo complexo envolvendo fatores transcricionais celulares e virais que atuam concomitantemente, podendo resultar na estimulação ou repressão da transcrição das proteínas oncogênicas do HPV (Bernard, 2002). Variantes moleculares distintos, apesar de pertencerem ao mesmo tipo viral, podem apresentar uma expressão gênica diferenciada (Kämmer *et al.*, 2000; Sichero *et al.*, 2005), uma vez que a variabilidade na LCR pode atingir até 5% entre esses isolados (Ho *et al.*, 1993).

6.1. Análise da variabilidade genética de variantes de HPV-31, -33, -35, -52 e -58.

O estudo da variabilidade intratípica do HPV permite a verificação das diferentes formas genéticas desse vírus e o estudo da origem e propagação dos diversos variantes ao redor do mundo. Além disso, a análise da variabilidade do HPV

é uma ferramenta importante em estudos epidemiológicos, visto que a infecção por determinados variantes moleculares apresentam uma tendência maior a se tornar persistente, um fator de risco para o desenvolvimento de lesões cervicais (Villa *et al.*, 2000; Xi *et al.*, 2006; Aho *et al.*, 2004; Gagnon *et al.*, 2007). A caracterização molecular destes isolados pode também contribuir para o conhecimento da associação de variantes específicos com uma maior oncogenicidade, além de ter potenciais implicações para o desenvolvimento e eficácia de uma vacina (Sichero e Villa, 2006), e de testes de diagnóstico e de marcadores laboratoriais da infecção.

Neste estudo, foi realizada a caracterização das sequências de nucleotídeos completas da LCR e do gene E6, além de um fragmento do gene tardio L1 de amostras oriundas do Distrito Federal infectadas com os HPV-31, -33, -35, -52 e -58. Alterações de aminoácidos detectadas nas proteínas E6 e L1 poderiam interferir na atividade destas. Além disso, substituições na LCR poderiam influenciar a localização e afinidade de sítios de ligação para fatores transcricionais celulares e viral.

A composição de sítios de ligação para fatores de transcrição na LCR, predita pelo programa MATCHTM, revelou algumas diferenças entre os cinco tipos de HPV analisados. Para esta análise, foram pesquisados sítios de ligação para fatores transcricionais que ativam (AP-1, E2, GRE, NF-1, Oct-1, TATA-box, Sp1 e c-Myc/c-Max) ou reprimem (YY1 e C/EBP) a transcrição viral (Bernard, 2002), previamente observados nas LCR dos HPV-16 e -18 e disponíveis na biblioteca de matrizes do programa TRANSFAC®. Na LCR do HPV-16 foram descritos quatro sítios de ligação para a proteína E2 viral, definindo a LCR em três segmentos distintos: 5', *enhancer* e 3' (O'Connor *et al.*, 1995). As LCR dos HPV-31, -33 e -52 também apresentaram quatro sítios de ligação para E2, enquanto que as dos HPV-35 e -58 apresentaram três e cinco sítios, respectivamente. Em geral, o maior número de sítios de ligação foi detectado para o fator de transcrição celular YY1, seguido de sítios para os fatores Oct-1 e C/EBP. Esses dados são similares aos descritos para o HPV-16 (O'Connor *et al.*, 1996; Bauknecht *et al.*, 1996), exceto pelo menor número de sítios de ligação para o fator Oct-1 observado na LCR do HPV-16 (O'Connor e Bernard, 1995). Sítios de ligação para o fator NF-1 na LCR do HPV-16 foram descritos apenas na região do *enhancer* (Chong *et al.*, 1991), entretanto, essa característica foi detectada apenas para os HPV-31 e -33. Foram também observadas algumas particularidades: a ausência de sítios de ligação para Sp-1 no HPV-33, para AP-1 no HPV-31 e do TATA-box nos HPV-33 e -52. Além disso, apenas na LCR do HPV-52

foi detectado um sítio para o elemento de resposta a glicocorticoíde (GRE) e, em nenhum dos tipos virais analisados foram detectados sítios de ligação para c-Myc/c-Max. É possível que a não observação de sítios para esses fatores se deva aos altos valores de coincidência utilizados nesta análise. De qualquer maneira, são necessários estudos que comprovem a existência e a relevância para a atividade transcricional viral dos sítios detectados nas posições preditas.

Apesar de laborioso e oneroso, o procedimento mais comumente utilizado para a caracterização dos diferentes variantes presentes em uma amostra biológica, até o momento, é o sequenciamento do DNA obtido a partir da amplificação por PCR utilizando-se iniciadores consensos ou específicos. Entretanto, o sequenciamento direto de um produto de PCR não é adequado para a caracterização de sequências oriundas de múltiplos tipos de HPV em uma mesma amostra, já que será detectado preferencialmente o tipo de HPV mais representado na mesma (Vernon *et al.*, 2000). Nas amostras deste estudo em que foram detectados previamente mais de um tipo de HPV, foi realizada a clonagem dos amplicons antes do sequenciamento. Desta forma, foi possível analisar os diferentes variantes presentes em 8 amostras que apresentavam co-infecção. O sequenciamento direto ou clonagem de produtos de duas reações de PCR independentes, além do sequenciamento de ao menos dois clones de cada variante detectado, garante a ausência de erros introduzidos durante a reação de amplificação.

Por meio da análise da sequência da LCR, pode-se observar que o tipo de HPV que apresentou a maior variabilidade genética foi o HPV-52 (3,03%), seguido do HPV-31 (2,38%), -58 (1,73%) e -35 (0,90%). Adicionalmente, a análise da sequência de um fragmento do gene L1 entre os isolados de HPV-33 revelou que a máxima distância genética foi de 0,98%. Neste estudo, 13 novos variantes foram caracterizados. O grande número de novos variantes detectados pode ser explicado por terem sido conduzidos poucos estudos, até o momento, acerca da variabilidade genética desses HPV menos prevalentes. Substituições de nucleotídeos que resultam na parada precoce da tradução ou em mudança na fase de leitura não foram detectadas nas sequências de E6 ou L1 analisadas.

É válido ressaltar que um fragmento de 545pb da LCR de três dos oito isolados de HPV-58 analisados neste estudo foram previamente caracterizados no estudo conduzido por Calleja-Macias *et al.* (2005). Entretanto, no presente estudo,

foram analisados não só um maior número de isolados de HPV-58, como também um fragmento do gene L1 e a sequência de nucleotídeos completa da LCR e do gene E6.

Os isolados de HPV-31 apresentaram variações nucleotídicas ainda não descritas na literatura nas posições 7860 e 3 da LCR, e nas posições 305, 306 e 537 do gene E6. Interessantemente, o isolado Bsb-36 apresentou a variação de G para C na posição 7860, ao invés de G para A previamente descrito por Calleja-Macias *et al.* (2004) e também detectada no isolado Bsb-216. Essa substituição se localiza sobreposta a um potencial sítio de ligação aos fatores de transcrição celular YY1 e Oct-1. Entretanto, o efeito das substituições encontradas sobre a ligação dos mesmos à LCR é ainda desconhecido.

As sequências da LCR dos dois isolados de HPV-33 analisados apresentaram uma deleção de 78pb previamente descrita na literatura (Gagnon *et al.*, 2004; Khouadri *et al.*, 2006). Foi observado que a ausência dessa deleção está associada com a persistência viral (Gagnon *et al.*, 2004), sugerindo, portanto, um papel supressivo para a presença do fragmento de 78pb *in vivo*. Além disso, a variação nucleotídica de C para G na posição 7732, detectada no isolado Bsb-23, foi associada com a presença de lesões cervicais de alto grau (Khouadri *et al.*, 2006).

Foi detectado um novo variante de HPV-35 (Bsb-121) que apresentou a variação nucleotídica de A para G na posição 7418 da LCR. Esta substituição não está localizada sobreposta a nenhum sítio de ligação aos fatores de transcrição analisados neste estudo utilizando-se o programa MATCH. Entretanto, é importante ressaltar que a atividade de uma região regulatória depende não só da presença dos motivos *cis*-responsivos, mas também das seqüências adjacentes (Ondek *et al.*, 1988).

O HPV-52 não só foi o tipo de HPV que apresentou a maior variabilidade nas três regiões genômicas analisadas, mas também aquele que apresentou o maior número de variações nucleotídicas ainda não descritas na literatura. Nove novas variações nucleotídicas foram detectadas na LCR do isolado Bsb-15, sendo muitas delas localizadas sobrepostas a potenciais sítios de ligação a fatores transcricionais celulares e viral. A substituição nucleotídica de T para G ou C na posição 7624 foi detectada em 2 de 4 amostras analisadas. Interessantemente, a mutação nessa posição parece estar associada com a persistência da infecção por HPV-52 (Aho *et al.*, 2004). Entretanto, o pequeno número de amostras analisadas neste estudo impossibilita considerações adicionais. Em relação ao gene L1, um novo variante foi detectado

(Bsb-20), apresentando uma variação nucleotídica não-sinônima na posição 6922, ainda não descrita na literatura.

Embora tenham sido detectadas quatro variações nucleotídicas na LCR dos isolados de HPV-58, observou-se que as sequências de E6 eram altamente conservadas, apresentando uma única variação em todos os isolados analisados. Isso é esperado, visto que o segmento da LCR está sob menor pressão seletiva que a região codificadora, e portanto pode apresentar um número maior de variações nucleotídicas (Yamada *et al.*, 1995).

As LCR dos isolados de HPV-31, -35 e -58 e, principalmente, as de HPV-33 e -52 analisados neste estudo, apresentaram um grande número de substituições nucleotídicas, sendo que algumas delas se encontram sobrepostas a potenciais sítios de ligação para fatores de transcrição, podendo, portanto, influenciar a expressão dos oncogenes virais. Além disso, as inserções e deleções detectadas podem modificar a estrutura da fita de DNA, podendo afetar a interação de fatores de transcrição com seus sítios de ligação localizados na LCR. Experimentos envolvendo deleções e mutações pontuais de nucleotídios da LCR indicaram que a atividade do *enhancer* viral depende da ativação cooperativa de muitos fatores de transcrição, sendo sua atividade muito reduzida pela eliminação dos sítios de ligação para AP-1 e NF-1 (Chong *et al.*, 1991). Adicionalmente, substituições nucleotídicas podem resultar na supressão da capacidade de ligação de fatores de transcrição específicos, ou pela redução da afinidade destes pelos seus sítios de reconhecimento, ou devido a alteração de sua habilidade em interagir com outras proteínas (Bernard, 2002).

Entre as amostras de HPV estudadas, foram detectadas substituições não silenciosas em ambos os genes E6 e L1, sendo que algumas resultaram em alterações não conservativas de aminoácidos. As substituições não conservativas levam a alteração das propriedades físico-químicas dos aminoácidos. No entanto, o efeito de cada mutação pontual sobre a atividade da proteína depende da posição e função do aminoácido alterado, além da combinação com outras variações possivelmente detectadas na mesma proteína.

6.2. Análise filogenética dos HPV-31, -33, -35, -52 e -58.

A análise da variabilidade nucleotídica intratípica dos HPV-16 e -18 tem sido extensivamente estudada e serve como ferramenta importante para traçar a filogenia e evolução destes vírus. Através da análise filogenética baseada em seqüências parciais

da LCR, foi descrito que os diferentes variantes dos HPV-16 e -18 parecem ter co-evoluído com os três maiores ramos filogenéticos humanos (africanos, caucasianos e asiáticos). Os variantes do HPV-16 foram agrupados em cinco clados distintos: Europeu (E), Asiático (As), Asiático–Americano (AA), Africano 1 (Af–1) e Africano 2 (Af–2) (Ho *et al.*, 1993; Chan *et al.*, 1992). A árvore filogenética de isolados do HPV-18 revela os ramos Africano (Af), Europeu (E) e Asiático Americano (AA) (Ong *et al.*, 1993). Variantes de cada um desses ramos estão diferentemente distribuídas nas diversas regiões geográficas (Ong *et al.*, 1993; Yamada *et al.*, 1997)

A análise filogenética dos HPV-31, -33 e -58 não revelou agrupamentos étnicos ou geográficos específicos como relatado para os HPV-16 e -18 (Ho *et al.*, 1993; Ong *et al.*, 1993), uma vez que as amostras de diferentes locais do mundo se localizaram por todos os ramos. Isso era esperado devido à pequena variabilidade detectada nas LCR dos HPV-31 e -58, e na sequência de L1 dos isolados de HPV-33, o que também justifica os valores de *bootstrap* não significativos na maioria das entradas dos ramos.

Baseado nas sequências de fragmentos da LCR, árvores dicotômicas foram previamente observadas para os variantes de HPV-33, -35, -53 e -66 (Calleja-Macias *et al.*, 2005; Khouadri *et al.*, 2006; Prado *et al.*, 2005). No presente estudo, não foi possível realizar a análise filogenética das sequências da LCR de isolados de HPV-33, já que as sequências obtidas em outros estudos não estão disponíveis no GenBank. Uma vez que essa dicotomia foi somente detectada entre subtipos de HPV, pode-se sugerir que o HPV-35 e -33, assim como os HPV-53 e -56, podem estar em um processo evolutivo que pode levar a novos subtipos e eventualmente a novos tipos de HPV (Prado *et al.*, 2005).

No estudo conduzido por Calleja-Macias *et al.* (2005), a análise filogenética do HPV-52 foi realizada a partir de sequências parciais da LCR de 66 amostras de diferentes regiões geográficas de várias partes do mundo, e 18 variantes genômicos distintos foram caracterizados. Foi sugerido a existência de um ramo Asiático-Nativo Americano. No presente estudo, a filogenia das sequências de HPV-52 divergiram marcadamente em quatro ramos distintos que apresentaram valores altos de *bootstrap*. Foi possível caracterizar ramos Asiático e Europeu, uma vez que as sequências de amostras provenientes desses continentes estavam concentradas nesses agrupamentos. Além disso, outro ramo era composto somente por duas sequências oriundas do Brasil (Bsb-15 and BR0258), podendo ser preliminarmente classificado como um ramo

Brasileiro. A formação deste ramo Brasileiro pode ser justificada pela alta variabilidade genética detectada exclusivamente na LCR destes isolados. Entretanto, outras amostras oriundas do Brasil estão localizadas em todos os outros ramos filogenéticos. O quarto ramo não mostrou relação étnica ou geográfica específica já que era composto por isolados originários do Brasil, México e Marrocos. Pelo exposto, pode-se sugerir que os variantes moleculares de HPV-52 co-evoluíram com os maiores grupos étnicos humanos, analogamente ao observado para os HPV-16 e -18, embora em uma taxa evolutiva mais lenta (Calleja-Macias *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 1993; Ong *et al.*, 1993). Entretanto, estudos com um maior número de amostras são necessários para consolidar a filogenia do HPV-52 observada no presente estudo.

A ausência de aglomerados étnicos ou geográficos específicos foi observada para genótipos de HPV que são raros quando comparados à alta prevalência do HPV-16. Não se sabe o motivo de diferentes genótipos de HPV apresentarem prevalência distinta, mas é provável que tipos mais abundantes se dispersem mais rápido que os genótipos raros. Conseqüentemente, a diversificação dos tipos raros do HPV ocorreria em uma escala de tempo diferente que a do HPV-16, portanto, não associada à dispersão dos principais grupos étnicos humanos no mundo (Prado *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos neste estudo foram recentemente publicados (Raiol *et al.*, 2009) e estão apresentados na forma de artigo científico no Anexo I. Até o momento, este é o estudo mais extenso acerca da variabilidade genética e da filogenia dos tipos de HPV de alto risco HPV-31, -33, -35, -52 e -58 detectados no Distrito Federal, ampliando o conhecimento sobre a diversidade desses vírus cujos dados disponíveis ainda são muito limitados.

6.3. Análise da atividade transcricional do promotor de E6/E7 de variantes de HPV-58.

Durante as últimas décadas, a comunidade científica tem se interessado em inferir funcionalmente a importância da variabilidade genética sob o potencial oncogênico dos diferentes variantes moleculares de HPV. A fim de avaliar o efeito das mutações sobre a atividade transcricional viral, ensaios que envolvem a quantificação da expressão de um gene repórter ligado a montante da LCR tem sido utilizados. Entretanto, é importante ressaltar que esses experimentos refletem uma situação artificial na qual a atividade está sendo medida utilizando-se um plasmídeo

episomal, em um meio celular definido e em uma cultura *in vitro*. Apesar dessas limitações, esses experimentos funcionais ainda são a melhor forma disponível de averiguar os efeitos das variações nucleotídicas sob a expressão viral.

Até o momento, não foram realizados estudos funcionais envolvendo variantes moleculares de outros tipos de HPV de alto risco menos prevalentes que os HPV-16 e -18. Foi observado que variantes moleculares de HPV-16 e -18 apresentam atividades transcricionais distintas (Kämmer *et al.*, 2000; Sichero *et al.*, 2005). Adicionalmente, a variabilidade das oncoproteínas E6 e E7 também tem significância funcional, como sugerido por estudos *in vivo* e *in vitro* (Stöppler *et al.*, 1996a; Choo *et al.*, 2000; Grodzki *et al.*, 2006; Contreras-Paredes *et al.*, 2009; Zehbe *et al.*, 2009).

Alguns estudos sugerem que funcionalmente variantes não-Europeus de HPV-16 são mais oncogênicos quando comparados a variantes Europeus. A maior oncogenicidade observada por essas variantes pode ser atribuída a um aumento na atividade transformante dos oncogenes E6 e E7 (Choo *et al.*, 2000; Zehbe *et al.*, 2009), a uma maior eficiência da replicação viral (Hubert, 2005) ou a uma maior estimulação da expressão dos genes precoces (Veress *et al.*, 1999; Kämmer *et al.*, 2000; Sichero *et al.*, 2005). Adicionalmente, a maior parte dos estudos biológicos e epidemiológicos conduzidos em populações com composição multi-étnica indicam que variantes Asiático-Americanos de HPV-16 e -18 são mais oncogênicos que variantes Europeus (Villa *et al.*, 2000, Berumen *et al.*, 2001; Hildesheim *et al.*, 2001; Sichero *et al.*, 2007; Xi *et al.*, 2007). Entretanto, estudos adicionais são necessários para avaliar o significado da variabilidade intratípica e a possível correlação com os dados gerados em estudos epidemiológicos.

No Distrito Federal, o HPV-58 é o segundo tipo mais prevalente, tendo sido detectado em 13,43% das amostras de lesões cervicais de alto grau analisadas (Câmara *et al.*, 2003). A alta prevalência de HPV-58 também foi relatada em amostras oriundas do Norte (7,1%) e Nordeste (8,2%) do Brasil (Lorenzato *et al.*, 2000; Noronha *et al.*, 1999), assim como em amostras provenientes do México (27,3%), Espanha (42,7%) e alguns países asiáticos, como Japão (15%) e China (23,8%) (Chan *et al.*, 1999; Giuliano *et al.*, 2001; Sasagawa *et al.*, 2001; Touze *et al.*, 2001).

Apesar da alta prevalência do HPV-58 em diferentes regiões do mundo, este é o único estudo conduzido até o momento, com o objetivo de analisar as consequências da variabilidade genética do HPV-58 sobre o potencial oncogênico do mesmo. Para tanto, objetivou-se analisar o efeito da variabilidade da LCR dos diferentes variantes

moleculares de HPV-58, detectados no Distrito Federal, sobre a atividade do promotor de E6/E7, localizado na LCR. Analogamente aos estudos realizados anteriormente utilizando-se variantes de HPV-16 (Kämmer *et al.*, 2000; Veress *et al.*, 1999) e -18 (Sichero *et al.*, 2005), as sequências da LCR completas do HPV-58 protótipo e de três variantes detectados no Distrito Federal foram clonadas a montante do gene repórter luciferase e transfectados transientemente em células C33. No presente estudo, foi observado que a LCR do HPV-18 protótipo é sete vezes mais ativa que a do HPV-16 protótipo. Esse dado é similar ao observado anteriormente por Sichero *et al.* (2005). Apesar do HPV-58 ser detectado com menos frequência no câncer cervical quando comparado ao HPV-16 (Clifford *et al.*, 2003), o HPV-58 protótipo apresentou uma atividade transcricional similar ao HPV-16 protótipo. Até o momento, o HPV-58 protótipo foi detectado apenas no Japão, quando foi descrito esse tipo viral (Matsukura e Sugase, 1990; Kirii *et al.*, 1991; Calleja-Macias *et al.*, 2005). Esses achados sugerem que é possível que o HPV-58 protótipo seja um variante molecular raro e geograficamente restrito. Outros dois variantes (Bsb-329 e Bsb-367) também apresentaram atividade transcricional similar ao dos HPV-16 e -58 protótipo. Assim, as variações nas posições 7265, 7266 e 7714 da LCR parecem ter pouca influência sobre a atividade do promotor de E6/E7 de HPV-58.

Por outro lado, o variante Bsb-295 de HPV-58 apresentou uma alta atividade transcricional, cerca de cinco vezes mais ativo que o HPV-58 e o HPV-16 protótipo, e estatisticamente similar ao HPV-18 protótipo. Isso sugere que o variante Bsb-295 de HPV-58 pode estar associado a um alto potencial oncogênico. Foi proposto que os variantes moleculares de HPV-18 diferem na patogênese do câncer cervical e que pequenas diferenças genômicas nas oncoproteínas E6 e E7 têm impacto substancial na progressão dessa doença (de Boer *et al.*, 2005). O HPV-18 está mais frequentemente associado ao desenvolvimento de adenocarcinoma do colo do útero que é caracterizado por ser um tipo de tumor mais agressivo, menos diferenciado e associado a um pior prognóstico quando comparado a tumores escamosos (Rose *et al.*, 1991). As propriedades de transformação e imortalização do HPV foram mapeadas a LCR-E6-E7, sendo possível portanto que variações nucleotídicas nessas regiões afetem as propriedades oncogênicas do HPV-18, e de outros tipos virais (Villa e Schlegel, 1991).

A substituição nucleotídica na posição 7788 é a característica distintiva do isolado Bsb-295 em relação aos outros variantes de HPV-58. Assim, o impacto dessa

variação sobre a atividade transcricional foi avaliada utilizando-se a técnica de mutagênese sítio-dirigida. Em comparação ao HPV-58 protótipo, a inserção da substituição nucleotídica na LCR do mutante Bsb-58mut induziu um aumento na atividade transcricional, estatisticamente similar à detectada para o isolado Bsb-295 e, inclusive, para o HPV-18 protótipo. Por outro lado, o mutante Bsb-329mut, que apresenta todas as variações detectadas na LCR dos isolados de HPV-58 caracterizados neste estudo, mostrou uma atividade transcricional muito baixa. Isso sugere que, apesar da substituição na posição 7788 induzir o promotor de E6/E7, na presença das outras três substituições nucleotídicas a atividade transcricional é inibida. Entretanto, o mecanismo molecular que levou a esse resultado ainda é desconhecido.

No presente estudo, foi realizada uma análise da composição de sítios de ligação para fatores de transcrição na LCR do HPV-58 protótipo *in silico*. De acordo com essa análise, a substituição nucleotídica na posição 7788 não se localiza sobreposta a nenhum sítio de ligação para fatores transcricionais celulares testados. Entretanto, estudos adicionais são necessários para averiguar a possível presença de sítios de ligação para fatores transcricionais celulares não pesquisados neste estudo e a influência que a variação na posição 7788 poderia ter sobre a ligação de fatores transcricionais a sítios próximos.

Os estudos conduzidos com variantes moleculares de HPV-16 e -18 revelaram que nenhuma alteração nucleotídica individual é responsável pelo aumento da atividade transcricional (Veress *et al.*, 1999; Kämmer *et al.*, 2000; Sichero *et al.*, 2005) Assim, acredita-se que a combinação das alterações nucleotídicas da LCR nos variantes moleculares seja responsável pelas diferenças funcionais observadas. No entanto, a análise da atividade transcricional do isolado Bsb-295 revelou que uma única variação nucleotídica é capaz de aumentar a atividade do promotor, podendo, por consequência, levar a uma expressão elevada dos oncogenes virais *in vivo*.

Os estudos sobre a variabilidade genética do HPV-58 e de outros tipos de alto risco mais raros que HPV-16 e -18 ainda são muito limitados. Entretanto, futuros estudos epidemiológicos e sobre os variantes de HPV-58 poderão averiguar a relação entre uma maior prevalência de variantes moleculares de HPV-58 com um maior potencial oncogênico, como possivelmente o variante Bsb-295, e regiões geográficas onde o HPV-58 tem sido mais frequentemente associado a lesões cervicais de alto grau.

A incidência de câncer cervical é muito maior nos países em desenvolvimento, principalmente na África e América Latina, que nos países desenvolvidos. Isso pode ser explicado em parte pela alta fertilidade, má nutrição e pela pequena cobertura dos sistemas de saúde pública nos países em desenvolvimento (WHO, 2007). É também importante ressaltar que variantes moleculares específicos de HPV podem apresentar um maior potencial oncogênico, podendo constituir um fator de risco adicional contribuindo para a maior prevalência de câncer cervical em populações em desenvolvimento nas diferentes regiões do mundo. Pelo exposto, a importância da variabilidade nucleotídica do HPV na prevalência do câncer do colo do útero deve ser afetada não apenas pela prevalência de cada variante nas diferentes populações, mas também por diferenças funcionais intrínsecas de cada variante.

7. Conclusões

- Foram detectados 13 novos variantes: 4 de HPV-31, 3 de HPV-33, 1 de HPV-35, 2 de HPV-52 e 3 de HPV-58.
- A variabilidade genética do HPV-52 (3,03%) foi a maior, seguido dos HPV-31 (2,38%), -58 (1,73%) e -35 (0,90%).
 - A máxima distância genética do HPV-33 foi de 0,98%.
- A composição de potenciais sítios de ligação na LCR difere entre os cinco tipos de HPV analisados e em relação ao HPV-16.
- Um grande número de variações nucleotídicas estavam localizadas em potenciais sítios de ligação, especialmente entre os variantes de HPV-33 e -52.
- A filogenia do HPV-52 revelou a presença de 4 clados distintos (Europeu, Asiático, Indeterminado e Brasileiro)
 - Ramos étnicos ou geográficos não foram encontrados para os outros tipos virais.
 - A filogenia dos HPV-31, -35 e -58 descrita na literatura foi confirmada neste estudo.
- O variante Bsb-295 de HPV-58 apresentou alta atividade transcricional similar ao HPV-18.
 - A variação nucleotídica na posição 7788 da LCR do variante Bsb-295 foi a principal responsável pelo aumento transcricional observado.
 - Os resultados sugerem que variantes de outros tipos de alto risco também podem apresentar potenciais oncogênicos distintos como de HPV-16 e -18

8. Bibliografia

- Abba MC, Laguens RM, Dulout FN, Golijow CD (2004) The c-myc activation in cervical carcinomas and HPV 16 infections. *Mutat Res* 557(2): 151-8.
- Adhikary S, Eilers M (2005) Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biol* 6: 635-645.
- Aho J, Hankins C, Tremblay C, Forest P, Pourreaux K, Rouah F, Coutlee F, Canadian Women's HIV Study Group (2004) Genomic polymorphism of human papillomavirus type 52 predisposes toward persistent infection in sexually active women. *J Infect Dis*, 190(1): 46-52.
- Aho J, Hankins C, Tremblay C, Lang F, Forest P, Pourreaux K, Rouah F, Coutlee F, The Canadian Women's HIV Study Group (2003) Molecular analysis of human papillomavirus type 52 isolates detected in the genital tract of human immunodeficiency virus-seropositive and -seronegative women. *J Infect Dis* 188(10): 1517-27.
- Alencar TR, Cerqueira DM, da Cruz MR, Wyant PS, Ramalho ED, Martins CR (2007) New HPV-16 European and non-European variants in Central Brazil. *Virus Genes* 35(1): 1-4.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Apt D, Chong T, Liu Y, Bernard HU (1993) Nuclear factor I and epithelial cell-specific transcription of human papillomavirus type 16. *J Virol* 67: 4455-4463.
- Apt D, Liu Y, Bernard HU (1994) Cloning and functional analysis of spliced isoforms of human nuclear factor I-X: interference with transcriptional activation by NFI/CTF in a cell-type specific manner. *Nucleic Acids Res* 22: 3825-3833.
- Arends M, Donaldson Y, Duvall E, Wyllie A, Bird C (1993) Human papillomavirus type 18 associates with more advanced cervical neoplasia than human papillomavirus type 16. *Hum Pathol* 24, 432-437.
- Arias-Pulido H, Peyton CL, Torrez-Martinez N, Anderson DN, Wheeler CM (2005) Human papillomavirus type 18 variant lineages in United States populations characterized by sequence analysis of LCR-E6, E2, and L1 regions. *Virology* 338(1): 22-34.

- Autier P, Coibion M, Huet F, Grivegne AR (1996) Transformation zone location and intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Br J Cancer* 74(3): 488-490.
- Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda MA, Howley PM (1987) Structural and translational analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* 61: 962–971.
- Baseman JG, Koutsky LA (2005) The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 32 Suppl 1: S16-24.
- Bauknecht T, See RH, Shi Y (1996) A Novel C/EBP b-YY1 Complex Controls the Cell-Type-Specific Activity of the Human Papillomavirus Type 18 Upstream Regulatory Region. *J Virol* 70(11): 7695–7705.
- Bauknecht T, Shi Y (1998) Overexpression of C/EBPbeta Represses Human Papillomavirus Type 18 Upstream Regulatory Region Activity in HeLa Cells by Interfering with the Binding of TATA-Binding Protein. *J. Virol* 72: 2113 - 2124.
- Berberich S, Hyde-DeRuyscher N, Espenshade P, Cole M. (1992) max encodes a sequence-specific DNA-binding protein and is not regulated by serum growth factors. *Oncogene* 7(4):775-9.
- Bernard HU (2002) Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *Ant Ther* 7: 219-237.
- Bernard HU (2005). The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 32: S1-6.
- Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, Peyton CL, Bauer HM, Wheeler CM (1994). Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 170(5), 1077-1085.
- Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, Yunes E, Garcia-Carranca A, Gonzales-Lira G, de La Campa AM (2001) Asian-American variants of human papillomavirus type 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 93(17): 1325–1330.
- Bosch X, Harper D (2006) Prevention strategies of cervical cancer in the HPV vaccine era. *Gynec Oncol* 103: 21–24.

- Bouallaga I, Massicard S, Yaniv M, Thierry F (2000). An enhanceosome containing the Jun B/Fra-2 heterodimer and the HMG-I(Y) architectural protein controls HPV 18 transcription. *EMBO Rep* 1(5): 422-7.
- Bousarghin L, Touzé A, Sizaret PY, Coursaget P (2003) Human Papillomavirus Types 16, 31, and 58 Use Different Endocytosis Pathways To Enter Cells. *J Virol* 77: 3846-3850.
- Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT (2004) Efficient Intracellular Assembly of Papillomaviral Vectors. *J Virol* 78: 751 - 757.
- Calleja-Macias IE, Kalantari M, Huh J, Ortiz-Lopez R, Rojas-Martinez A, Gonzalez-Guerrero JF, Williamson AL, Hagmar B, Wiley DJ, Villarreal L, Bernard HU, Barrera-Saldana HA. 2004. Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants. *Virol* 319(2): 315-23.
- Calleja-Macias IE, Villa LL, Prado JC, Kalantari M, Allan B, Williamson A-L, Chung L-P, Collins RJ, Zuna RE, Dunn ST, Chu T-Y, Cubie HA, Cuschieri K, von Knebel-Doeberitz M, Martins CR, Sanchez GI, Bosch FX, Munoz N, Bernard HU (2005) Worldwide Genomic Diversity of the High-Risk Human Papillomavirus Types 31, 35, 52, and 58, Four Close Relatives of Human Papillomavirus Type 16. *J Virol* 79: 13630 - 13640.
- Camara GNL, Cerqueira DM, Oliveira APG, Silva EO, Carvalho LGS, Martins CRF (2003) Prevalence of human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions in the Federal District of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98(7): 879-883.
- Cerqueira DM, Camara GNL, Cruz MR, Silva EO, Brígido MM, Carvalho LGS, Martins CRF (2003) Variants of human papillomavirus types 53, 58, 66 identified in central Brazil. *Virus Genes* 26(1): 83-87.
- Cerqueira DM, Moraes DS, Camara GN, Amaral FA, Oyama CN, dos Santos, MQ, Martins CR (2007). High HPV genetic diversity in women infected with HIV-1 in Brazil. *Arch Virol* 152(1): 75-83.
- Chan PKS, Lam CW, Cheung TH, Li, WH, Lo, KWK, Chan, MYM, Cheng, AF, Cheung, JLK (2002) Association of human papillomavirus type 58 variant with the risk of cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 94: 1249 – 1253.

- Chan PKS, Li WH, Ma WI, Cheung JLK, Cheng AF (1999) High prevalence of human papillomavirus type 58 in Chinese women with cervical cancer and pre-cancerous lesions *J Med Virol* 59: 232-238.
- Chan WK, Chong T, Bernard HU, Klock G (1990) Transcription of the transforming genes of the oncogenic human papillomavirus-16 is stimulated by tumor promoters through AP1 binding sites. *Nucleic Acids Res* 18: 763-769.
- Chan WK, Klock G, Bernard HU (1989) Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *J Virol* 63:3261-3269.
- Cheng S, Schmidt-Grimminger DC, Murant T, Broker TR, Chow LT (1995) Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev* 9: 2335-2349.
- Chong T, Apt D, Gloss B, Isa M, Bernard HU (1991) The enhancer of human papillomavirus-16: binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1 and AP1 participate in the epithelial specific transcription. *J Virol* 65(11): 5933-5943.
- Choo KB, Wang TS, Huang CJ (2000) Analysis of relative binding activity of E7-pRB of human papillomavirus type 16 clinical variants using the yeast two-hybrid system. *J Med Virol* 61: 298-302.
- Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJF, Vaccarella S, Anh PTH, Ferreccio C, Hieu NT, Matos E, Molano M, Rajkumar R, Ronco G, de Sanjosé S, Shin HR, Sukvirach S, Thomas JO, Tunsakul S, Meijer CJML, Franceschi S, The IARC HPV Prevalence Surveys Study Group (2005) Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet* 366: 991-998.
- Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S (2003) Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 89(1): 101-5.
- Contreras-Paredes A, De la Cruz-Hernandez E, Martinez-Ramirez I, Duenas-Gonzalez A, Lizano M (2009) E6 variants of human papillomavirus 18

- differentially modulate the protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinase (akt/PI3K) signaling pathway. *Virology* 383(1): 78-85.
- Cripe TP, Haugen TH, Turk JP, Tabatabai F, Schmid PG, Durst M, Gissmann L, Roman A, Turek LP (1987) Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J* 6(12): 3745-3753.
- Day PM, Baker CC, Lowy DR, Schiller JT (2004) Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *PNAS* 101: 14252-14257.
- Day PM, Roden RB, Lowy DR, Schiller JT (1998) The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol* 72(1): 142-150.
- de Boer MA, Peters LA, Aziz MF, Siregar B, Cornain S, Vrede MA, Jordanova ES, Fleuren GJ (2005). Human papillomavirus type 18 variants: histopathology and E6/E7 polymorphisms in three countries. *Int J Cancer* 114(3): 422-5.
- de Boer MA, Peters LA, Aziz MF, Siregar B, Cornain S, Vrede MA, Jordanova ES, Kolkman-Uljee S, Fleuren GJ (2004). Human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and The Netherlands. *Gynecol Oncol* 94(2): 488-494.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324(1): 17-27.
- del Mistro A, Chieco Bianchi L (2001) HPV-related neoplasias in HIV-infected individuals. *Eur J Cancer* 37(10): 1227-35.
- Disbrow GL, Hanover JA, Schlegel R (2005) Endoplasmic Reticulum-Localized Human Papillomavirus Type 16 E5 Protein Alters Endosomal pH but Not trans-Golgi pH. *J Virol* 79: 5839-5846.
- Dong G, Broker TR, Chow LT (1994) Human papillomavirus type 11 E2 proteins repress the homologous E6 promoter by interfering with the binding of host transcription factors to adjacent elements. *J Virol* 68: 1115-1127.

- Dong XP, Pfister H (1999) Overlapping YY1- and aberrant SP1-binding sites proximal to the early promoter of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* 80: 2097-2101.
- Doorbar J (2005) The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* , 32 Suppl 1, S7-S15.
- Doorbar J (2006) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 110(5): 525-541.
- Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L (1991) Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352(6338): 824-7.
- Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E (1989) The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243: 934-937.
- Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA (1997) Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* 71: 2449-2456.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred I Accuracy assessment. *Genome Res* 8(3):175-185.
- Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (2005). *Virus Taxonomy: The Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. (Elsevier, Ed.) Academic Press.
- Ferrera A, Velema JP, Figueroa M, Bulnes R, Toro LA, Claros JM, de Barahona O, Melchers WJ (1999) Human papillomavirus infection, cervical dysplasia and invasive cervical cancer in Honduras: a case-control study. *Int J Cancer* 82(6): 799-803.
- Florin L, Sapp C, Streeck RE, Sapp M (2002). Assembly and Translocation of Papillomavirus Capsid Proteins. *J Virol* 76: 10009-10014.
- Franco E, Schlecht NF, Saslow D (2003) The epidemiology of cervical cancer. *Cancer J*. 9:348-359.
- Franco EL, Harper DM (2005) Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. *Vaccine* 23(17-18): 2388-94.

- Gagnon S, Hankins C, Money D, Pourreaux K, The Canadian Women's HIV Study Group, Franco E, Coutlée F (2007) Polymorphism of the L1 capsid gene and persistence of human papillomavirus type 52 infection in women at high risk or infected by HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr* 44:61-65.
- Gagnon S, Hankins C, Tremblay C, Forest P, Pourreaux K, Coutlee F, Canadian Women's HIV Study Group (2004) Viral polymorphism in human papillomavirus types 33 and 35 and persistent and transient infection in the genital tract of women. *J Infect Dis* 190(9): 1575-85.
- Gagnon S, Hankins C, Tremblay C, Pourreaux K, Forest P, Rouah F, The Canadian Women's HIV Study Group, Coutlée F (2005) Polymorphism of human papillomavirus type 31 isolates infecting the genital tract of HIV-seropositive and HIV-seronegative women at risk for HIV infection. *J Med Virol* 75: 213-221.
- Galvin KM, Shi Y (1997) Multiple mechanisms of transcriptional repression by YY1. *Mol Cell Biol* 17, 3723 - 3732.
- Garbuglia AR, Carletti F, Minosse C, Piselli P, Zaniratti MS, Serraino D, Capobianchi MR. 2007. Genetic variability in E6 and E7 genes of human papillomavirus -16, -18, -31 and -33 from HIV-1-positive women in Italy. *New Microbiol* 30(4): 377-82.
- Genther SM, Sterling S, Duensing S, Münger K, Sattler C, Lambert PF (2003) Quantitative Role of the Human Papillomavirus Type 16 E5 Gene during the Productive Stage of the Viral Life Cycle. *J Virol* 77: 2832 - 2842.
- Giuliano AR, Papenfuss M, Abrahamsen M, Denman C, de Zapien JG, Henzen JLN, Ortega L, de Gala EMB, Stephan J, Feng J, Baldwin S, Garcia F, Hatch K (2001) Human papillomavirus infection at the United States-Mexico border: implications for cervical cancer prevention and control. *Cancer Epidemiol. Biomarkers and Prevention* 10: 1129-1136.
- Gloss B, Bernard HU (1990) The E6/E7 promoter of human papillomavirus type 16 is activated in absence of E2 proteins by a sequence-aberrant SpI distal element. *J Virol* 64: 5577-5584.
- Gloss B, Bernard HU Seedorf K, Klock G (1987) The upstream regulatory region of the human papilloma virus-16 contains an E2 protein-independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones. *EMBO J* 6(12): 3735-3743.

- Grodzki M, Besson G, Clavel C, Arslan A, Franceschi S, Birembaut P, Tommasino M, Zehbe I (2006) Increased Risk for Cervical Disease Progression of French Women Infected with the Human Papillomavirus Type 16 E6-350G Variant. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15: 820-822.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95-98.
- Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind A, Zahaf T, Innis B, Naud P, de Carvalho ND, Roteli-Martins CM, Teixeira J, Blatter MM, Korn AP, Quint W, Dubin G, Glaxosmithkline HPV Vaccine Study Group (2004) Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* 364(9447): 1757-65.
- Hildesheim A, Schiffman M, Bromley C, Wacholder S, Herrero R, Rodriguez A, Bratti MC, Sherman ME, Scarpidis U, Lin QQ, Terai M, Bromley RL, Buetow K, Apple RJ, Burk RD (2001) Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J Natl Cancer. Inst* 93: 315-318.
- Hiller T, Poppelreuther S, Stubenrauch F, Iftner T (2006) Comparative Analysis of 19 Genital Human Papillomavirus Types with Regard to p53 Degradation, Immortalization, Phylogeny, and Epidemiologic Risk Classification. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15: 1262 - 1267.
- Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD (1998) Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 338:423-8.
- Ho H, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fuginaga K, Icenogle JP, Kahn T, Kiviat N, Lancaster W, Mavromara-Nazos P, Labropoulou V, Mitrani-Rosenbaum S, Norrild B, Pillai MR, Stoerker J, Syrjaenen K, Syrjaenen S, Tay SK, Villa LL, Wheeler CM, Williamson AL, Bernard HU (1993) The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol* 67(11): 6413-6423.
- Holmgren SC, Patterson NA, Ozbun MA, Lambert PF (2005) The Minor Capsid Protein L2 Contributes to Two Steps in the Human Papillomavirus Type 31 Life Cycle. *J Virol* 79: 3938-3948.

- Hoppe-Seyler F, Butz K, zur Hausen H (1991) Repression of the human papillomavirus type 18 enhancer by the cellular transcription factor Oct-1. *J Virol* 65(10): 5613-5618.
- Hubert WG (2005) Variant Upstream Regulatory Region Sequences Differentially Regulate Human Papillomavirus Type 16 DNA Replication throughout the Viral Life Cycle. *J Virol* 79(10): 5914-5922.
- Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM (1991) A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J* 10(13): 4129-4135.
- IARC (2007) *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Vol. 90, Smokeless Tobacco Products, Lyon, InC 689 p.
- INCA (2008), Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Disponível na internet: <http://www.incA.gov.br/estimativas/2008/index.asp>.
- Ishiji T, Lace MJ, Parkkinen S, Anderson RD, Haugen TH, Cripe TP, Xiao JH, Davidson I, Chambon P, Turek LP (1992) Transcriptional enhancer factor (TEF)-1 and its cell-specific co-activator activate h papillomavirus-16 E6 and E7 oncogene transcription in keratinocytes and cervical carcinoma cells. *EMBO J* 11: 2271-2281.
- Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, Jansen KU, Keller M (1999) The L1 Major Capsid Protein of Human Papillomavirus Type 11 Recombinant Virus-like Particles Interacts with Heparin and Cell-surface Glycosaminoglycans on Human Keratinocytes. *J Biol Chem* 274(9): 5810-5822.
- Kabsch K, Alonso A (2002) The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *J Virol* 76(23):12162-72.
- Kämmer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, Wheeler CM, Pfister H (2000) Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J Gen Virol* 81: 1975-1981.
- Kel AE, Gößling E, Reuter I, Cheremushkin E, Kel-Margoulis OV, Wingender E (2003) MATCH: a tool for searching transcription factor binding sites in DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 31, 3576 - 3579.

- Khouadri S, Villa LL, Gagnon S, Koushik A, Richardson H, Ferreira S, Tellier P, Simao J, Matlashewski G, Roger M, Franco EL, Coutlee F (2006) Human papillomavirus type 33 polymorphisms and high-grade squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *J Infect Dis* 194(7): 886-94.
- Kirii Y, Iwamoto S, Matsukura T (1991) Human papillomavirus type 58 DNA sequence. *Virology* 185(1):424-7.
- Kiyono T, Foster SA, Koop Jenn I, McDougall JK, Galloway DA, Klingelutz AJ (1998) Both Rb/p16ink4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396: 84-88.
- Klingelutz AJ, Foster SA, McDougall JK (1996). Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 380:79-82.
- Kocjan BJ, Seme K, Mocilnik T, Jancar N, Vrtacnik-Bokal E, Poljak M (2007). Genomic diversity of human papillomavirus genotype 53 in an ethnogeographically closed cohort of white European women. *J Med Virol* 79(4), 431 - 438.
- Lake JA (1987) A rate-independent technique for analysis of nucleic acid sequences: evolutionary parsimony. *Mol Biol Evol* 4: 167-191.
- Lechner MS, Laimins LA (1994). Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol* 68, 4262-4273.
- Lee SS, Glaunsinger B, Mantovani F, Banks L, Javier RT (2000) Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *J Virol* 74:9680-9693.
- Lichtig H, Algrisi M, Botzer Le, Abadi T, Verbitzky Y, Jackman A, Tommasino M, Zehbe I, Sherman L (2006) HPV16 E6 natural variants exhibit different activities in functional assays relevant to the carcinogenic potential of E6. *Virology* 350(1): 216-227.
- Lin H, Ma YY, Moh JS, Ou YC, Shen SY, ChangChien CC (2006) High prevalence of genital human papillomavirus type 52 and 58 infection in women attending gynecologic practitioners in South Taiwan. *Gynecol Oncol* 101(1): 40-5.
- Lizano M, Berumen J, Guido MC, Casas L, Garcia-Carranca A (1997) Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 89:1227-1231.

- Longworth MS, Laimins LA (2004) The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol* 78:3533-3541.
- Lorenzato, F., Ho, L., Terry, G., Singers, A., Santos, L. C., De Lucena Batista, R. & Lubambo, T. (2000) The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). *Int J Gynecol Cancer* 10: 143 – 150.
- Lowy DR, Schiller JT (2006) Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest* 116: 1167-1173.
- Maciag PC, Schlecht NF, Souza PS, Rohan TE, Franco EL, Villa LL (2002) Polymorphisms of the Human Leukocyte Antigen DRB1 and DQB1 Genes and the Natural History of Human Papillomavirus Infection. *J Infect Dis* 186:164-172.
- Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM (1989) Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 7: 209-214.
- Massimi P, Gammoh N, Thomas M, Banks L (2004) HPV E6 specifically targets different cellular pools of its PDZ domain-containing tumour suppressor substrates for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* 23(49): 8033-9.
- Matsukura T, Sugase M (1990) Molecular cloning of a novel human papillomavirus (type 58) from an invasive cervical carcinoma. *Virol* 177(2): 833-6.
- May M, Dong XP, Beyer-Finkler E, Stubenrauch F, Fuchs PG, Pfister H (1994) The E6/E7 promoter of extrachromosomal HPV-16 DNA in cervical cancers escapes from cellular repression by mutation of target sequences for YY1. *EMBO J* 13: 1460-1466.
- McBride AA, Romanczuk H, Howley PM (1991) The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J Biol Chem* 266: 18411-18414.
- McPhillips MG, Ozato K, McBride AA (2005) Interaction of Bovine Papillomavirus E2 Protein with Brd4 Stabilizes Its Association with Chromatin. *J Virol* 79, 8920-8932.
- Ministério da Saúde (2003). *Lista Nacional de Agravos de Notificação Compulsória*. Disponível em Site do Ministério da Saúde: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portaria2325.pdf>

- Miyashita M, Agdamag DM, Sasagawa T, Matsushita K, Salud LM, Salud CO, Saikawa K, Leano PS, Pagcaliwagan T, Acuna J, Ishizaki A, Kageyama S, Ichimura H (2009) High-risk HPV types in lesions of the uterine cervix of female commercial sex workers in the Philippines. *J Med Virol* 81(3):545-51.
- Modis Y, Trus BL, Harrison SC (2002) Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J* 21(18): 4754-4762.
- Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL (2006) Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* 24S3: 42-51.
- Münger K, Howley PM (2002) Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 89:213-228.
- Muñoz N (2000) Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 19: 1-5.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJF, Meijer CJLM (2003) Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med* 348(6): 518-527.
- Nakahara T, Peh WL, Doorbar J, Lee D, Lambert, P F (2005) Human papillomavirus type 16 E1⁺E4 contributes to multiple facets of the papillomavirus life cycle. *J Virol* 79, 13150–13165.
- Nindl I, RindFleisch K, Lotz B, Scheider A, Dürst M (1999) Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer. *Int J Cancer* 82: 203-207.
- Noronha V, Mello W, Villa LL, Macedo R, Bisi F, Mota R, Sassamoto K, Monteiro T, Linhares A (1999) Human Papillomavirus associated with cervix lesions. *Ver Soc Bras Med Trop* 32: 235-240.
- Nürnberg W, Artuc M, Vorbrueggen G, Kalkbrenner F, Moelling K, Czarnetzki BM, Schadendorf D (1995) Nuclear proto-oncogene products transactivate the human papillomavirus type 16 promoter. *Br J Cancer* 71(5):1018-24.
- O'Connor M, Bernard HU (1995) Oct-1 activates the epithelial-specific enhancer of human papillomavirus type 16 via a synergistic interaction with NF1 at a conserved composite regulatory element. *Virol* 207: 77-88.

- O'Connor MJ, Tan SH, Tan CH, Bernard HU (1996) YY1 represses human papillomavirus type 16 transcription by quenching AP-1 activity, *J Virol* 70: 6529-6539.
- O'Connor M, Chan SY, Bernard HU (1995) Transcription Factor Binding Sites in the Long Control Region of Genital HPVs. In: *Human Papillomaviruses 1995 Compendium* disponível na Internet: <http://hpv-web.lanl.gov/stdgen/virus/hpv/compendium/htdocs/>
- Oelze I, Kartenbeck J, Crusius K, Alonso A (1995) Human papillomavirus type 16 E5 protein affects cell-cell communication in an epithelial cell line. *J Virol* 69: 4489-94.
- Offord EA, Beard P (1990). A member of the activator protein 1 family found in keratinocytes but not in fibroblasts required for transcription from a human papillomavirus type 18 promoter. *J Virol* 64: 4792-4798.
- Ondek B, Gloss L, Herr W (1988) The SV40 enhancer contains two distinct levels of organization. *Nature* 333, 40-45.
- Ong CK, Chan SY, Campo MS, Fujinaga K, Mavromara-Nazos P, Lapropoulou V, Pfister H, Tay SK, ter Meulen J, Villa LL, Bernard HU (1993) Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol* 67(11): 6424 – 6431.
- Pater MM, Hughes GA, Hyslop DE, Nakshatri H, Pater A (1988) Glucocorticoid-dependent oncogenic transformation by type 16 but not type 11 human papilloma virus DNA. *Nature* 335: 832-835.
- Patterson NA, Smith JL, Ozbun MA (2005) Human Papillomavirus Type 31b Infection of Human Keratinocytes Does Not Require Heparan Sulfate. *J Virol* 79, 6838 - 6847.
- Pereira CR, Rosa ML, Vasconcelos GA, Faria PC, Cavalcanti SM, Oliveira LH (2007) Human papillomavirus prevalence and predictors for cervical cancer among high-risk women from Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Gynecol Cancer* 17(3): 651-60.
- Prado JC, Calleja-Macias IE, Bernard HU, Kalantari M, Macay SA, Allan B, Williamson AL, Chung LP, Collins RJ, Zuna RE, Dunn ST, Ortiz-Lopez R, Barrera-Saldana HA, Cubie HA, Cuschieri K, von Knebel-Doeberitz M, Sanchez GI, Bosch FX, Villa LL (2005) Worldwide genomic diversity of the

- human papillomaviruses-53, 56, and 66, a group of high-risk HPVs unrelated to HPV-16 and HPV-18. *Virology* 340(1): 95-104.
- R Development Core Team (2007) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.Rproject.org>.2007.
- Raiol T, Wyant PS, Amorim RMS, Cerqueira DM, Milanezi NG, Brígido MM, Sichero L, Martins CRF (2009) Genetic variability and phylogeny of the high-risk HPV-31, -33, -35, -52 and -58 in Central Brazil. *J Med Virol* 81(4):685-692.
- Reddy KJ, Banapour B, Anderson DE, Lee SH, Marquez JP, Carlos MP, Torres JV (2004) Induction of immune responses against human papillomaviruses by hypervariable epitope constructs. *Immunol* 112(2): 321-327.
- Roden RB, Ling M, Wu T C (2004) Vaccination to prevent and treat cervical cancer. *Hum Pathol* 35(8): 971-982.
- Rose B, Steger G, Dong XP, Thompson C, Cossart Y, Tattersall M, Pfister H (1998) Point mutations in SP1 motifs in the upstream regulatory region of human papillomavirus type 18 isolates from cervical cancers increase promoter activity. *J Gen Virol* 79: 1659-1663.
- Rose BR, Thompson CH, Cossart YE, Elliot PE, Tattersall MH (1991) Papillomavirus DNA and prognosis in cervical cancer. *Lancet* 337(8739): 489.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *PNAS* 74: 5463 - 5467.
- Sarafi TR, McBride AA (1995) Domains of the BPV-1 E1 replication protein required for origin-specific DNA binding and interaction with the E2 transactivator. *Virology* 211(2): 385-396.
- Sasagawa T, Basha W, Yanazaki H, Inoue M (2001) High-risk and multiple human papillomavirus infections associated with cervical abnormalities in Japanese women. *Cancer Epidem Biomarkers Prev* 10: 45-52.
- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP Complex Functions as a Ubiquitin- Protein Ligase in the Ubiquitination of p53. *Cell* 75: 495-505.

- Schmidt M, Kedzia W, Gozdzicka-Jozefiak A (2001) Intratype HPV16 sequence variation within LCR of isolates from asymptomatic carriers and cervical cancers. *J Clin Virol* 23: 65 - 77.
- Shafti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R (2003). Different Heparan Sulfate Proteoglycans Serve as Cellular Receptors for Human Papillomaviruses. *J Virol* 77: 13125-13135.
- Sherman L, Jackman A, Itzhaki A, Stoppler MC, Koval D, Schlegel R (1997) Inhibition of serum- and calcium-induced differentiation of human keratinocytes by HPV16 E6 oncoprotein: role of p53 inactivation. *Virology* 37(2): 296-306.
- Sichero L, Ferreira S, Trottier H, Duarte-Franco E, Ferenczy A, Franco EL, Villa LL (2007) High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *Int J Cancer* 120(8): 1763-8.
- Sichero L, Franco EL, Villa LL (2005) Different P105 promoter activities among natural variants of human papillomavirus type 18. *J Infect Dis* 191(5): 739-42.
- Sichero L, Villa LL (2006) Epidemiological and functional implications of molecular variants of human papillomavirus. *Braz J Med Biol Res* 39:707-717.
- Smith JS, Green J, de Gonzalez AB, Appleby P, Peto J, Plummer M, Franceschi S, and Bera V (2003) Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet* 361(9364): 1159-67.
- Speck LM, Tying SK (2006) Vaccines for the prevention of human papillomavirus infections. *Skin Therapy Lett* 11(6): 1-3.
- Stewart AC, Eriksson AM, Manos MM, Munoz N, Bosch FX, Peto J, Wheeler CM (1996) Intratype variation in 12 human papillomavirus types: a worldwide perspective. *J Virol* 70: 3127 - 3136.
- Stoler MH, Rhodes CR, Whitbeck A, Wolinsky SM, Chow LT, Broker TR (1992) Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum Pathol* 23(2): 117-128.
- Stöppler MC, Ching K, Stöppler H, Clancy K, Schlegel R, Icenogle J (1996a) Natural variants of human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol* 70: 6987-6993.

- Stöppler MC, Straight SW, Tsao G, Schlegel R and McCance DJ (1996b) The E5 gene of HPV-16 enhances keratinocyte immortalization by full-length DNA. *Virology* 223(1): 251-4.
- Straight SW, Hinkle PM, Jewers RJ, McCance DJ (1993) The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J Virol* 67, 4521-4532.
- Tan SH, Bartsch D, Schwartz E, Bernard HU (1998) Nuclear attachment regions of human papillomavirus type 16 point toward conservation of these genomic elements in all genital papillomaviruses. *J Virol* 72(5): 3610-3622.
- Tan SH, Gloss B, Bernard HU (1992). During negative regulation of the human papillomavirus-16E6 promoter, the viral E2 protein can displace Sp1 from a proximal promoter element. *Nucleic Acids Res* 20: 251-256.
- Tan SH, Leong LE, Walker PA, Bernard HU (1994). The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIID. *J Virol* 68: 6411-6420.
- Tang S, Tao M, McCoy JP, Zheng ZM (2006) The E7 Oncoprotein Is Translated from Spliced E6*I Transcripts in High-Risk Human Papillomavirus Type 16- or Type 18-Positive Cervical Cancer Cell Lines via Translation Reinitiation. *J Virol* 80: 4249 - 4263.
- Thierry F, Spyrou G, Yaniv M, Howley P (1992) Two API Sites Binding JunB Are Essential for Human Papillomavirus Type 18 Transcription in Keratinocytes. *J Virol* 66(6): 3740-3748.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- Tornesello ML, Buonaguro FM, Buonaguro L, Salatiello I, Belth-Giraldo E, Giraldo G (2000) Identification and functional analysis of sequence rearrangements in the long control region of human papillomavirus type 16 Af-1 variants isolated from Ugandan penile carcinomas. *J Gen Virol* 81: 2969-2982.

- Touze A, de Sanjose S, Coursaget P, Almirall M R, Palacio V, Meijer CJL, Kornegay J, Bosch FX (2001) Prevalence of anti-human papillomavirus type 16, 18, 31 and 58 virus-like particles in women in the general population and in prostitutes *J Clin Microbiol* 39: 4344-4348.
- Trus BL, Roden RB, Greenstone HL, Vrhel M, Schiller JT, Booy FP (1997) Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a three-dimensional reconstruction to 9 Å resolution. *Nat Struct Biol* 4(5), 413-420.
- Tsao YP, Li LY, Tsai TC, Chen SL (1996) Human papillomavirus type 11 and 16 E5 represses p21(Waf1/Sdi1/Cip1) gene expression in fibroblasts and keratinocytes. *J Virol* 70:7535–9
- Turek LP, Smith EM (1996). The genetic program of genital human papillomaviruses in infection and cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am* 23(4): 735-758.
- Vaccarella S, Herrero R, Snijders PJF, Dai M, Thomas JO, Hieu NT, Ferreccio C, Matos E, Posso H, de Sanjosé S, Shin HR, Sukvirach S, Lazcano-Ponce E, Muñoz N, Meijer CJLM, Franceschi S, the IARC HPV Prevalence Surveys (IHPS) Study Group (2008) Smoking and human papillomavirus infection: pooled analysis of the International Agency for Research on Cancer HPV Prevalence Surveys. *Int J Epidemiol* 37(3): 536-546.
- Varsani A, Williamson AL, Jaffer MA, Rybicki EP (2006). A deletion and point mutation study of the human papillomavirus type 16 major capsid gene. *Virus Research*, 122: 154-163.
- Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R (2001) Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol* 75:4467-4472.
- Veras VS, Cerqueira DM, Martins CRF (2005) L1 sequence of a new human papillomavirus type-58 variant associated with cervical intraepithelial neoplasia. *Braz J Med Biol Res* 38(1): 1-4.
- Veress G, Szarka K, Dong XP, Gergely L, Pfister H (1999) Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* 80: 1035-1043.
- Vernon SD, Unger ER, Williams D (2000) Comparison of Human Papillomavirus Detection and Typing by Cycle Sequencing, Line Blotting, and Hybrid Capture. *J Clin Microb* 38(2): 651–655

- Villa LL (1997) Human papillomaviruses and cervical cancer. *Adv Cancer Res* 71: 321-341
- Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Ault KA, Giuliano AR, Wheeler C, Koutsky L, Malm C, Lehtinen M (2005) Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol* 6(5): 271-278.
- Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, Franco EL (2000) Molecular variants of human papillomavirus type 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol* 81: 2959-2968.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz NJ (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Pathol* 189: 12-19.
- Wang Q, Griffin H, Southern S, Jackson D, Martin A, McIntosh P, Davy C, Masterson PJ, Walker PA, Laskey P, Omary MB, Doorbar J (2004) Functional Analysis of the Human Papillomavirus Type 16 E1{wedge}E4 Protein Provides a Mechanism for In Vivo and In Vitro Keratin Filament Reorganization. *J Virol* 78: 821-833.
- Werness BA, Levine AJ, Howley PM (1990) Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248:76-79.
- WHO, 2007. WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Summary report on HPV and cervical cancer statistics in Brazil. 2007. Disponível na Internet: www.who.int/hpvcentre.
- Wiley DJ, Douglas J, Beutner K, Tom C, Fife K, Moscicki AB, Fukumoto L (2002) External Genital Warts: Diagnosis, Treatment, and Prevention *Clin Infect Dis* 35:S210–S224.
- Wilson R, Fehrmann F, Laimins LA (2005) Role of the E1{wedge}E4 Protein in the Differentiation-Dependent Life Cycle of Human Papillomavirus Type 31. *J Virol* 79: 6732 - 6740.
- Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D (2002) Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes* 24(3): 275-290.
- Wingender E, Dietze P, Karas H, Knuppel R (1996) TRANSFAC: a database on transcription factors and their DNA binding sites. *Nucleic Acids Res* 24: 238-241.

- Wu Y, Chen Y, Li L, Yu G, He Y, Zhang Y (2006) Analysis of mutations in the E6/E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolates from China. *J Gen Virol*, 87: 1181-8.
- Wyant (2007) Caracterização Molecular dos HPVs de Alto Risco dos Genótipos -53, -56 e -66 Infectando Mulheres no Distrito Federal e Entorno. Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, 98p.
- Xi LF, Kiviat NB, Hildesheim A, Galloway DA, Wheeler CM, Ho J, Koutsky LA (2006) Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence. *J Natl Cancer Inst* 98:1045-1052.
- Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, Kyspers J, Hughes JP, Wheeler CM (1997) Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 89(11): 796-802.
- Xi LF, Koutsky LA, Hildesheim A, Galloway DA, Wheeler CM, Winer RL, Ho J, Kiviat NB (2007) Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18. *Cancer Epidem Biomarkers Prev* 16(1): 4-10.
- Xin CY, Matsumoto K, Yoshikawa H, Yasugi T, Onda T, Nakagawa S, Yamada M, Nozawa S, Sekiya S, Hirai Y, Shiromizu K, Fujii T, Taketani Y (2001) Analysis of E6 variants of human papillomavirus type 33, 52 and 58 in Japanese women with cervical intraepithelial neoplasia/cervical cancer in relation to their oncogenic potential. *Cancer Lett* 170(1): 19-24.
- Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Muñoz N, Bosch FX, Wheeler CM (1997) Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* 71(3): 2463-2472.
- Yamada T, Manos MM, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart ACM, Hildesheim A, Jenison SA (1995) Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol* 69(12): 7743-7753.
- You J, Croyle JL, Nishimura A, Ozato K, Howley PM (2004) Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* 117(3): 349-360.
- Zehbe I, Richard C, DeCarlo CA, Shai A, Lambert PF, Lichtig H, Tommasino M, Sherman L (2009) Human papillomavirus 16 E6 variants differ in their

dysregulation of human keratinocyte differentiation and apoptosis. *Virology* 383(1): 69-77.

Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M (1998) Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res* 58: 829-833.

Zerial M, Toschi L, Ryseck R-P, Schuermann M, Muller R, Bravo R (1989). The product of a novel growth factor activated gene, fos B, interacts with JUN proteins enhancing their DNA binding activity. *EMBO J* 8(3): 805-813,

Zhao KN, Hengst K, Liu WJ, Liu YH, Liu XS, McMillan NA, Frazer IH (2000). BPV1 E2 Protein Enhances Packaging of Full-Length Plasmid DNA in BPV1 Pseudovirions. *Virology* 272: 382-393.

zur Hausen H (1996) Papillomavirus infections - a major cause of human cancer. *Biochim Biophys Acta* 1288: F55-78.

zur Hausen H (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2(5): 342-50.

Genetic Variability and Phylogeny of the High-Risk HPV-31, -33, -35, -52, and -58 in Central Brazil

Tainá Raiol,¹ Patricia Soares Wyant,^{1,2} Regina Maria Santos de Amorim,¹ Daniela Marreco Cerqueira,^{1,3} Natália von Gal Milanezi,¹ Marcelo de Macedo Brigido,¹ Laura Sicheo,⁴ and Cláudia Renata Fernandes Martins¹

¹Department of Cellular Biology, Institute of Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil

²Departments of Molecular Biology and Plant Virology, Institute of Biology, University of Stuttgart, Stuttgart, Germany

³ANVISA, Health Ministry, São Paulo, Brazil

⁴Department of Virology, Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo, Brazil

More than 100 HPV types have been described, 13 of which are classified as high-risk due to their association with the development of cervical cancer. The intratype genomic diversity of HPV 16 and 18 has been studied extensively, while little data have been generated for other less common high risk types. The present study explores the nucleotide variability and phylogeny of the high-risk HPV 31, 33, 35, 52, and 58, in samples from Central Brazil. For this purpose, the LCR and the E6 and L1 genes were sequenced. Several variants of these HPV types were detected, some of which have been detected in other parts of the world. Furthermore, new variants of all types examined were characterized in a total of 13 new variants. Based on the E6 and L1 sequences, variants were described comprising conservative and non-conservative amino acid changes. For phylogenetic tree construction, samples characterized in this study were compared to others described and submitted to GenBank previously. The phylogenetic analysis of HPV 31, 33, 35, and 58 isolates did not reveal ethnic or geographical clustering as observed previously for HPV 16 and 18. HPV-35 analysis showed a dichotomic branching characteristic of viral subtypes. Interestingly, four clusters relative to the analysis of HPV 52 isolates were identified, two of which could be classified as Asian and European branches. The genomic characterization of HPV variants is crucial for understanding the intrinsic geographical relatedness and biological differences of these viruses and contributes further to studies on their infectivity and pathogenicity. **J. Med. Virol.** 81:685–692, 2009. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: HPV; molecular variants; viral phylogeny; central Brazil; genetic variability

INTRODUCTION

Cervical neoplasia is the second leading cause of death from cancer among women worldwide and it is associated with infection by the human papillomavirus (HPV) in more than 99% of cases [Walboomers *et al.*, 1999]. To date, more than 100 HPV types have been described based on the isolation and sequencing of the complete genome [de Villiers *et al.*, 2004]. A new papillomavirus is recognized when the L1 nucleotide sequence differs by more than 10% from other types. Differences in homology between 2% and 10% define a subtype, and those with less than 2% in the L1 sequence characterize a variant [de Villiers *et al.*, 2004]. However, nucleotide variability among molecular variants can be as high as 5% in the non-coding region (LCR or long control region) [Ho *et al.*, 1993], thus allowing better characterization of variants when determining the nucleotide pattern of the LCR. The International Agency for Research on Cancer (IARC) classifies 13 types as carcinogenic, once they are associated epidemiologically with the development of anogenital cancer (HPV-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, and -66) [IARC, 2007].

Due to the high prevalence of HPV-16 and -18 not only among asymptomatic women but also in samples of neoplasia worldwide, several studies have been conducted to describe the molecular variants of these viral types [Ho *et al.*, 1993; Ong *et al.*, 1993]. Furthermore, the association between intratypal variants of HPV-16

CRFM died on October 28, 2007.

Grant sponsor: Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos (FINEP); Grant sponsor: Programa Nacional de DST/AIDS, Ministério da Saúde, Brazil.

Correspondence to: Laura Sicheo, Department of Virology, Ludwig Institute for Cancer Research, Rua João Juliano, 245, 01323-908 São Paulo, SP, Brazil. E-mail: lsicheo@ludwig.org.br

Accepted 25 November 2008

DOI 10.1002/jmv.21432

and -18 and the risk of prevalent and incident high-grade lesions has been demonstrated [Xi et al., 1997; Sichero et al., 2007]. Nevertheless, data concerning molecular variants of other less prevalent high-risk HPV types are still limited, making further studies essential to expand knowledge of variants.

The HPV LCR contains regulatory elements and binding sites for cellular and viral factors that control viral transcription and replication [O'Connor et al., 1995]. E6 is one of the main viral oncoproteins [zur Hausen, 2002]. Among high-risk HPV types, E6 targets the p53 tumor suppressor protein for degradation, thus facilitating the immortalization and transformation of the infected cells [Hiller et al., 2006]. L1 is the major capsid protein and is important for neutralizing antibody recognition [Day et al., 2007].

The present study aimed to expand data regarding the LCR, E6 and L1 genetic variability among HPV-31, -33, -35, -52, and -58 isolates. Taxonomically, these high-risk types together with HPV-16 constitute the species *Human Papillomavirus 16* of the genus *Alphapapillomavirus* [Fauquet et al., 2005]. In addition, the ethnic or geographic clustering of the sequences generated were investigated by phylogenetic analysis.

MATERIALS AND METHODS

Clinical Specimens

Samples examined in this study were obtained from cervical scrapes of women treated at public and private hospitals in the Distrito Federal, Central Brazil, from 1998 to 2006. These specimens have been genotyped previously [Camara et al., 2003; Cerqueira et al., 2007]. All HPV-31, -33, -35, -52, and -58 positive specimens obtained were separated for molecular variant analysis.

HPV Variant Analysis

Unfortunately, only a fraction of the samples obtained could be examined in relation to the LCR, E6 and L1 genomic region due to either insufficient DNA or technical failure. The LCR of 12 HPV-31 samples, 4 HPV-35 samples and 4 HPV-52 samples, and also the E6 gene of 11 HPV-31 samples, 6 HPV-35 samples, 4 HPV-52 samples, and 8 HPV-58 samples were amplified using specific primers [Calleja-Macias et al., 2004, 2005]. In addition, seven HPV-33 and eight HPV-58 samples were amplified with specific primers for the LCR and the E6 gene (33LCR-F: 5'-cacatcgtctgcaaaacgca-3', 33LCR-R: 5'-agtgtctccatgcttgca-3'; 33E6-F: 5'-gtagggtgtsacggsagcggg-3'; 33E6-R: 5'-tcctttaacgctggcttctgtc-3'; 58LCR-F: 5'-ectactaccgctgaccatccacc-3'; 58LCR-R: 5'-cgcagagagagaaccacggcattg-3'). A fragment of the L1 gene was also amplified from 10 HPV-31, 7 HPV-33, 1 HPV-35, 4 HPV-52, and 7 HPV-58 samples using the MY09/11 primers [Manos et al., 1989]. Each PCR mixture contained 0.8 μ M of each primer, 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), and 1 U of Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA). Forty amplification cycles were run in the MJ Research PTC-

100 Thermocycler with a 95 °C denaturing step (60 sec), a 55 °C annealing step (60 sec), and a 72 °C extension step (120 sec). These conditions were used for all PCRs, with the exception of the HPV-33 LCR and the HPV-52 LCR and E6 amplifications, in which annealing was conducted at 51 °C. In each PCR, a negative control was included to eliminate false positives.

PCR products of the expected size were sequenced automatically in the Megabace System 500 sequencer (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) using DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit (MegaBACE™, Amersham Pharmacia Biotech) to obtain both forward and reverse sequences. All samples tested in this study were submitted to two independent PCR in order to confirm detected mutations. For samples with a single HPV type infection, PCR products were sequenced directly. Products from co-infected samples (n = 8) were cloned in pGEM T Easy Vector (Promega, Madison, WI) prior to sequencing, according to the manufacturer's instructions in *Escherichia coli* DH5 α strain. At least two clones were sequenced for each genomic region.

Sequences were examined for nucleotide divergence relative to the sequences of HPV-31 (GenBank: J04353, isolated in Germany), -33 (GenBank: M12732 isolated in France), -35 (GenBank: M74117, isolated in the United States), -52 (GenBank: X74481, isolated in the United States) and -58 (GenBank: D90400, isolated in Japan). Comparisons were carried out using the BLAST (basic local alignment search tool) [Altschul et al., 1997] followed by alignment using CLUSTALW [Thompson et al., 1994]. HPV-31, -35, -52, and -58 LCR sequences were used to determine the intratype genetic distance. For this purpose, the nucleotide patterns of each HPV type examined were compared not only to the sequences described in this study, but also to those submitted previously to GenBank. The same procedure concerning L1 sequences from HPV-33 isolates. Deletions and insertions were considered as single events. New variants were submitted to GenBank with the following accession numbers: LCR Bsh-36-FJ202000; LCR Bsh-299-FJ202001; E6 Bsh-216-FJ202002; E6 Bsh-233-FJ202003; L1 Bsh-23-FJ202004; L1 Bsh-24-FJ202005; L1 Bsh-31-FJ202006; LCR Bsh-121-FJ202007; LCR Bsh-15-FJ202008; L1 Bsh-20-FJ202009; LCR Bsh-295-FJ202010; LCR Bsh-329-FJ202011; LCR Bsh-367-FJ202012.

The MATCH™ software [Kel et al., 2003] was used to search within the LCR of the five HPV types analyzed for potential binding sites for cellular and viral transcriptional factors described previously to bind the LCR of HPV-16 and -18: AP-1, E2, GRE, NF- κ B, Oct-1, TATA, YY1, C/EBP, Sp1, and c-Myc/c-Max. Cut-off values and coincidence levels between consensus binding sites and the LCR sequence of each type were adjusted in order to minimize both the number of negative and positive faults.

Phylogenetic Analysis

Phylogenetic trees for HPV-31, -35, -52, and -58 isolates were constructed using the LCR sequences obtained in this study, along with those from other parts

E2, respectively. Concerning the E6 gene, all eight isolates examined had the same sequence pattern with one variation at position 307 (C to T), as reported previously [Xin et al., 2001; Calleja-Macias et al., 2005]. One out of two variants characterized in the L1 fragment contained a new variation at nucleotide position 6727.

The intratypal genetic distance was determined after comparing the LCR sequences of HPV-31, -35, -52, and -58 isolates or the L1 sequence of HPV-33 variants with those from the GenBank database. The maximal distance between any two isolates, including the prototype and non-prototype sequences, was 12 mutations (2.4%) for HPV-31 isolate Bsb-227, 4 variations (0.9%) for HPV-33 isolates Bsb-23 and Bsb-31, 6 variations (0.9%) for HPV-35 isolate Bsb-121, and 8 variations (1.7%) for HPV-58 isolates Bsb-93 and Bsb-295. The HPV-52 isolate Bsb-15 showed the highest genetic distance, with 22 variations (3%) relative to the HPV-52 reference sequence. Interestingly, a divergence of 2.6% was observed when comparing the L1 fragment of this isolate to the HPV-52 prototype. Overall, 13 isolates described were new variants relative to their reference sequences.

Phylogenetic analysis was undertaken using the nucleotide sequences described in the current study and those available at GenBank. The phylogenetic trees obtained for HPV-31 and -58 confirmed the results reported previously by Calleja-Macias et al. [2005], showing conserved sequences with no ethnic or geographical distribution. This was also observed for HPV-33 isolates (data not shown). Furthermore, the phylogenetic analysis of HPV-35 sequences revealed a dichotomic tree with two deep branches similar to the data described by Calleja-Macias et al. [2005]. One of these clusters was composed exclusively by variants comprising a 16 bp insertion, and the other was composed by variants lacking this insertion (Figs. 1C and 3A), revealing the importance of this nucleotide distinction for the formation of these clusters.

Phylogenetically, HPV-52 isolates were arranged in four branches with high bootstrap values. Isolates Bsb-15 and BR0258 [Calleja-Macias et al., 2005] composed one branch, since their sequences are similar but quite different from the others. Interestingly, these LCR sequences were detected only among Brazilian samples. Another cluster was composed by sequences originated from Mexico, Brazil, and Morocco. All European isolates were concentrated on the largest branch, along with samples from other parts of the world. Finally, the last branch was composed of Asiatic sequences and could be regarded as an Asian cluster.

DISCUSSION

Globally, the most prevalent HPV type is HPV-16, detected in approximately 40% of high-grade cervical lesions [Clifford et al., 2003]. However, the prevalence of other high-risk HPV types varies among different countries and even throughout regions of the same

country [IARC, 2007]. HPV-31 and -33 are the second and third detected most frequently types in high-grade cervical lesions worldwide, respectively. In central Brazil, those are the third and fifth most prevalent types [Camara et al., 2003]. HPV-52 and -35 are, respectively, the sixth and seventh most prevalent types in high-grade cervical lesions worldwide [IARC, 2007], but both are the seventh prevalent types in central Brazil [Camara et al., 2003]. Nevertheless, in women with HIV from central Brazil and within some countries in Asia, HPV-52 is rather prevalent [Clifford et al., 2003; Cerqueira et al., 2007]. In addition, HPV-58 is the fifth most frequent type worldwide [IARC, 2007], while it is the second most common type in central Brazil [Camara et al., 2003], and it is also very prevalent in some Latin American and Asian countries [et al., 1999; Giuliano et al., 2001; Sasagawa et al., 2001; Touze et al., 2001]. HPV type distribution in women with high-grade cervical lesions in central Brazil is similar to the rest of the country, being HPV-16 (40.6%) the most frequent type, followed by HPV-58 (8.4%), -31 (6.5%), -33 (4.5%), -45 (3.3%), -18 (1.9%), and -35, -66, and -6 (0.6%) [WHO, 2007].

In the current study, nucleotide sequence characterization of the LCR, E6 and L1 genes of HPV-31, -33, -35, -52, and -58 samples from central Brazil was conducted. Amino acid changes detected in the E6 and L1 genes could interfere with the activity of these proteins. In addition, substitutions within the LCR could influence the location and binding affinity of cellular and viral transcriptional factors binding sites. To date, functional studies involving molecular variants of less prevalent HPV high-risk types have not been published. In contrast, specific HPV-16 and -18 molecular variants were shown to have distinct transcriptional activity [Kammer et al., 2000; Sicheo et al., 2005] and to present biochemical and biological differences of E6 functions [Stoppler et al., 1996].

In this study, 13 new variants were characterized. Nucleotide variations detected could not be ascribed to errors introduced by Taq DNA polymerase since each substitution was confirmed by an independent second PCR and sequencing reactions. Furthermore, nucleotide substitutions resulting in premature stop codon or frameshift were not detected neither in the L1 or E6 genes. The high number of new variants detected can be explained by the very few studies that have been conducted to date concerning the genetic variability of these less prevalent high-risk HPV types.

It is noteworthy that three of the HPV-58 isolates described above were included previously in the study conducted by Calleja-Macias et al. [2005]. However, the present study describes not only a higher number of HPV-58 isolates but also the analysis of L1 MY09/11 fragment and the whole LCR/E6 nucleotide sequences.

Interestingly, the HPV-31 isolate Bsb-36 showed a variation of G to C at nucleotide position 7860, instead of G to A as described previously [Calleja-Macias et al., 2004] and also detected in isolate Bsb-216. This

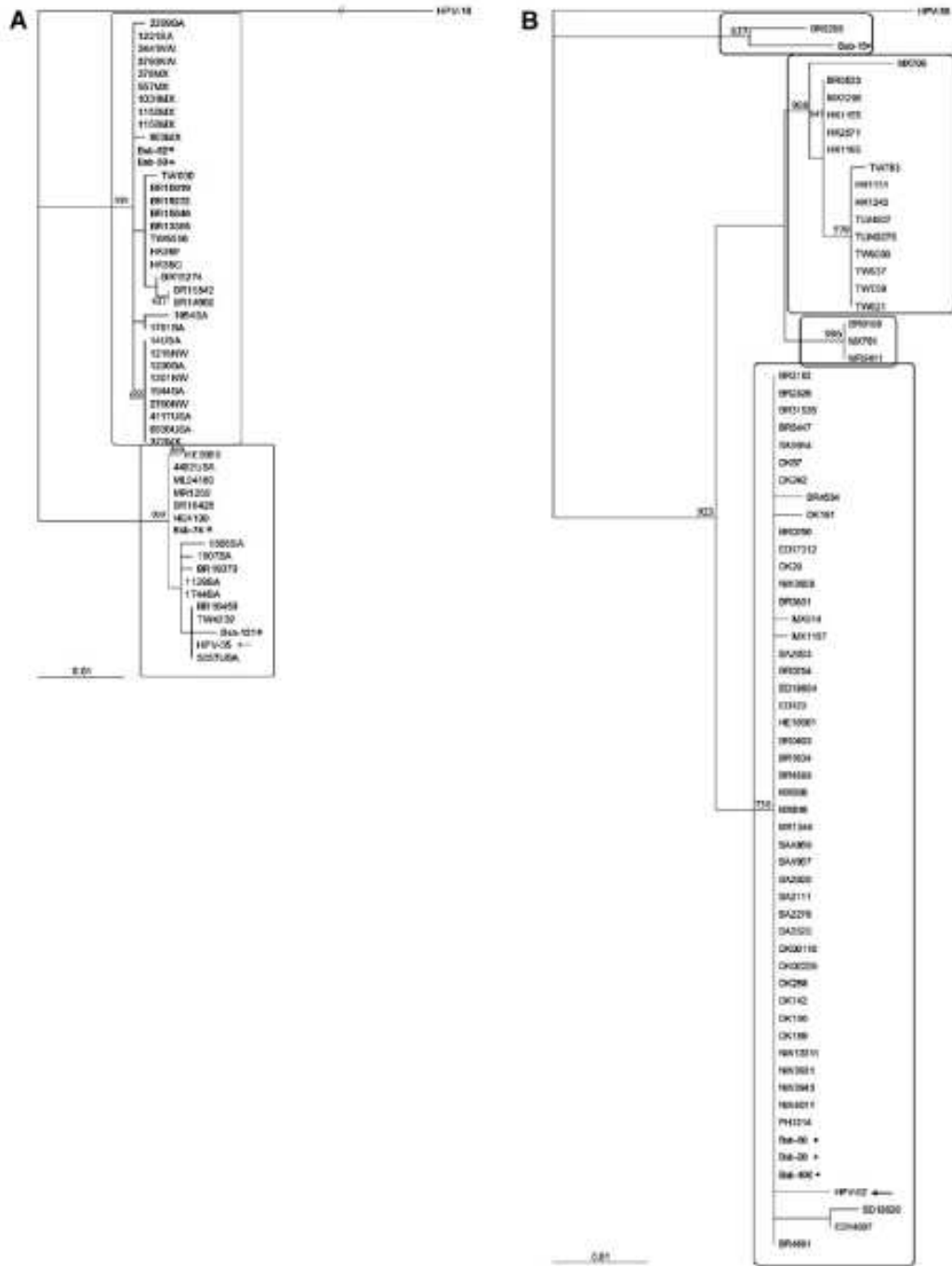


Fig. 3. Maximum parsimony tree of (A) HPV 35 and (B) HPV 32 isolates detected in central Brazil and from GenBank database [Calleja Manasset al., 2004, 2005]. HPV 18 and 58 were used as outgroup in HPV 35 and 32 tree construction, respectively. The numbers next to the branch points of the tree are bootstrap values (1,000 replicates). Only values higher than 50% are shown. The arrow and asterisks indicates the HPV-35 reference sequence and variants described in this study, respectively. Rectangular boxes highlight major branches observed for HPV-35 and -32 phylogenetic analysis.

substitution overlaps a potential binding site for YY1 and/or Oct cellular transcription factors. However, the effect of either substitution upon the binding of these proteins is unknown as yet.

All HPV-33 LCR sequences examined had a 78 bp deletion [Gagnon et al., 2004; Khouadri et al., 2006]. It was observed that the absence of this deletion was associated with viral persistence, thus suggesting a suppressive role for the presence of this deletion *in vivo* [Gagnon et al., 2004].

Only one new HPV-35 molecular variant was characterized, comprising a variation at LCR nucleotide position 7418. Nevertheless, this substitution was suggested not to influence the binding of any cellular transcriptional factor when this sequence was analyzed with the MATCH software.

Among HPV-52 isolates, the LCR 7624 (T → G or C) substitution was detected in two out of four samples tested. Interestingly, this mutation was suggested to be associated with the persistence of HPV-52 infection [Aho et al., 2004]. However, the small number of samples examined in this study does not allow any further considerations.

Although four nucleotide variations within the LCR of HPV-58 isolates were detected, the E6 sequences were highly conserved with only one variation observed in all isolates examined. This is not unexpected, because the LCR segment is under less selective pressure than the coding region, and thus may present a larger number of nucleotide variations [Yamada et al., 1995].

The phylogenetic trees of HPV-31, -33, and -58 did not show ethnic or geographic relatedness as reported for HPV-16 and -18 [Ho et al., 1993; Ong et al., 1993]. Based on the LCR sequences, dichotomic trees were observed previously for HPV-33, -35, -53, and -66 [Calleja-Macias et al., 2005; Prado et al., 2005; Khouadri et al., 2006]. It was not possible to perform phylogenetic analysis based on the HPV-33 LCR sequence patterns in this study, because no sequences were available at the GenBank database. Given that dichotomy was detected only among HPV subtypes, it could be suggested that HPV-35 and HPV-33, as well as HPV-53 and -56, could be in an evolutionary process that may lead to new HPV subtypes and eventually new types [Prado et al., 2005].

In the study conducted by Calleja-Macias et al. [2005], HPV-52 phylogenetic analysis was performed based on the LCR sequence of 66 samples from different geographical regions from all parts of the world and 18 genomic variants were characterized. The existence of an Asian-Native American branch was suggested. In this study, phylogenetic grouping of HPV-52 sequences diverged markedly on four branches. Bootstrapping led to the characterization of one Asian and one European cluster, once sequences from these continents were concentrated in these branches. In addition, another branch was composed by only two Brazilian sequences (Bsb-15 and BR0258) and could be assigned preliminarily as a Brazilian branch. Nevertheless, Brazilian samples were also detected in all the other branches. The fourth branch did not show any ethnic or

geographical relatedness since it was composed by isolates from Brazil, Mexico, and Morocco. Based on this data, it could be hypothesized that HPV-52 molecular variants coevolved with the major human ethnic groups, similar to HPV-16 and -18 although at a slower rate [Ho et al., 1993; Ong et al., 1993; Calleja-Macias et al., 2005]. Nevertheless, studies with a larger number of samples are necessary to further consolidate the phylogeny of HPV-52 and its relation with ethnicity.

ACKNOWLEDGMENTS

Taina Raiol received a fellowship from CNPq.

REFERENCES

- Aho J, Hankins C, Tremblay C, Lang P, Forest P, Poiroux K, Rouah F, Gouttes P. The Canadian Women's HIV Study Group. 2000. Molecular analysis of human papillomavirus type 52 isolates detected in the genital tract of human immunodeficiency virus-seropositive and -seronegative. *J Infect Dis* 188:1517–1527.
- Aho J, Hankins C, Tremblay C, Forest P, Poiroux K, Rouah F, Gouttes P. Canadian Women's HIV Study Group. 2004. Genomic polymorphism of human papillomavirus type 52 predisposes toward persistent infection in sexually active women. *J Infect Dis* 190:46–52.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1990. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 18:3405–3409.
- Calleja-Macias IE, Kalantar M, Böh J, Ortiz-Lopez R, Rous-Martinez A, Gonzalez-Guerrero JF, Williamson AL, Hagmar B, Wiley DL, Villarreal L, Bernard HU, Barrera-Saldana HA. 2004. Genomic diversity of human papillomavirus-16, -31, and -55 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants. *Virology* 319:315–323.
- Calleja-Macias IE, Villa LL, Prado JC, Kalantar M, Allan B, Williamson A-L, Chung L-P, Collins RJ, Zuma RE, Dano ST, Chu T-Y, Cuba HA, Guschieri K, von Krogh-Dobner M, Martins CR, Sanchez GI, Bosch FX, Munoz N, Bernard HU. 2005. Worldwide genomic diversity of the high-risk human papillomavirus types 31, 35, 52, and 58: four close relatives of human papillomavirus Type 16. *J Virol* 79:13630–13640.
- Cumara GN, Gesteira DM, Oliveira AP, Silva EO, Carvalho LI, Martins CR. 2003. Prevalence of human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions in the Federal District of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98:879–882.
- Cumara GN, Moraes DS, Cumara GN, Amaral FA, Oyama CN, dos Santos Mq, Martins CR. 2007. High HPV genetic diversity in women infected with HIV-1 in Brazil. *Arch Virol* 152:75–88.
- Chan PKS, Li WH, Ma WJ, Cheung JK, Cheng AF. 1999. High prevalence of human papillomavirus type 58 in Chinese women with cervical cancer and pre-cancerous lesions. *J Med Virol* 69:232–238.
- Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. 2003. Comparison of HPV type distribution in high grade cervical lesions and cervical cancer: A meta-analysis. *Br J Cancer* 89:101–105.
- Day PM, Thompson CD, Buck CB, Pang YYS, Lowy DR, Schiller JT. 2007. Neutralization of Human Papillomavirus with monoclonal antibodies reveals different mechanisms of inhibition. *J Virol* 81:8784–8792.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17–27.
- Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. 2005. Virus taxonomy: The eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. 8th edition. London: Academic Press, Inc., 1259 p.
- Felsenstein J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17:568–576.
- Gagnon S, Hankins C, Tremblay C, Forest P, Poiroux K, Gouttes P. Canadian Women's HIV Study Group. 2004. Viral polymorphism in human papillomavirus types 33 and 35 and persistent and transient infection in the genital tract of women. *J Infect Dis* 190:1575–1585.

- Gagnon S, Hankins C, Tremblay C, Pourrasaux K, Forest P, Rouah F, Coutué F, The Canadian Women's HIV Study Group. 2005. Polymorphism of human papillomavirus type 31 isolates infecting the genital tract of HIV-seropositive and HIV-seronegative women at risk for HIV infection. *J Med Virol* 75:313–321.
- Gagnon S, Hankins C, Money D, Pourrasaux K, Franco E, Coutué F, The Canadian Women's HIV Study Group. 2007. Polymorphism of the L1 capsid gene and persistence of human papillomavirus type 52 infection in women at high risk or infected by HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr* 44:61–65.
- Garbuglia AR, Carletti F, Minosse C, Pilelli P, Zanardi MS, Serraino D, Capobianchi MR. 2007. Genetic variability in E6 and E7 genes of human papillomavirus -16, -18, -31, and -33 from HIV-1-positive women in Italy. *New Microbiol* 30:377–382.
- Giuliano AE, Pappachou M, Abrahamson M, Denman C, de Zagon JI, Henzen JN, Ortega I, de Gala EMR, Stephan J, Feng J, Balshwin S, Garcia F, Hatch K. 2001. Human papillomavirus infection at the United States-Mexico border: Implications for cervical cancer prevention and control. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:1129–1136.
- Hiller T, Poppelreuther S, Stubenrauch F, Ittner T. 2006. Comparative analysis of 19 genital human papillomavirus types with regard to p53 degradation, immortalization, phylogeny, and epidemiologic risk classification. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:1262–1267.
- Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Pujuguet K, Iremongor JP, Kahn T, Kiviat N, Lancaster W, Mayromara Nazos P, Labropoulou V, Mirani-Rosenbaum S, Norrild B, Pillai MR, Stoelker J, Syrjänen K, Syrjänen S, Tay SK, Villa LL, Wheeler CM, Williamson AL, Bernard HU. 1993. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol* 67:6413–6423.
- IARC. 2007. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 90. Smokeless Tobacco Products, Inc.: Lyon: 680 p.
- Kammer U, Warthorst U, Torres-Martinez N, Wheeler CM, Pfister H. 2000. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J Gen Virol* 81:1975–1981.
- Kel AE, Göbbling E, Reuter I, Cherenushkin E, Kel-Margolis OV, Wingender E. 2003. MATCH: A tool for searching transcription factor binding sites in DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 31:3576–3579.
- Rhoadri S, Villa LL, Gagnon S, Koutlik A, Richardson H, Ferreira S, Tellier P, Simoes J, Matkushewski G, Roger M, Franco EL, Coutée F. 2006. Human papillomavirus type 33 polymorphisms and high-grade squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *J Infect Dis* 194:886–894.
- Manns MM, Ting Y, Wright DR, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. 1989. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 7:209–214.
- O'Connor M, Chan SY, Bernard HU. 1995. Transcription Factor Binding Sites in the Long Control Region of Genital HPVs. Human Papillomaviruses 1995. Compendium available at: http://epi.west.lanl.gov/stddgen/virus/hpv/compendium/htboxes-HTML_PILRS HPVcompantrod.html.
- Ong CK, Chan SY, Campo MS, Fujinaga K, Mayromara Nazos P, Labropoulou V, Pfister H, Tay SK, ter Meulen J, Villa LL, Bernard HU. 1993. Evolution of human papillomavirus type 18: An ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect cointegration with human ethnic groups. *J Virol* 67:6424–6431.
- Page RDM. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12:357–358.
- Prado JC, Calleja-Macias IE, Bernard HU, Kalantari M, Macay SA, Allan B, Williamson AL, Chung LP, Collins RJ, Zuna RE, Dunn ST, Ortiz-Lopez R, Barrera-Saldana HA, Cubie HA, Cuschieri K, Von Knebel-Doeberitz M, Sanchez GI, Bosch FX, Villa LL. 2005. Worldwide genomic diversity of the human papillomaviruses-55, 56, and 66, a group of high-risk HPVs unrelated to HPV-16 and HPV-18. *Virology* 340:96–104.
- Sasagawa T, Basha W, Yanaiaki H, Inoue M. 2001. High risk and multiple human papillomavirus infections associated with cervical abnormalities in Japanese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:45–52.
- Sánchez I, Franco EL, Villa LL. 2005. Different P105 promoter activities among natural variants of human papillomavirus type 18. *J Infect Dis* 191:739–742.
- Sánchez I, Ferreira S, Traillor H, Duarte-Franco E, Ferenczy A, Franco EL, Villa LL. 2007. High-grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *Int J Cancer* 120:1763–1768.
- Stewart AC, Eriksson AM, Manns MM, Munoz N, Bosch FX, Peto J, Wheeler CM. 1996. Intratype variation in 12 human papillomavirus types: A worldwide perspective. *J Virol* 70:3127–3136.
- Stupples MC, Ching K, Stupples H, Clancy K, Schlegel R, Iremonger J. 1996. Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol* 70:6987–6993.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680.
- Touze A, de Santiago S, Goussaget P, Almira M, Palacio V, Meijer CJL, Kornegay J, Bosch FX. 2001. Prevalence of anti-human papillomavirus type 16, 18/31 and 58 virus-like particles in women in the general population and in prostitutes. *J Clin Microbiol* 39:4344–4348.
- Walbooms JM, Jacobs MV, Manns MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz NJ. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Pathology* 106:12–19.
- WHO. 2007. WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Summary report on HPV and cervical cancer statistics in Brazil, 2007. Available at www.who.int/hpccentre/.
- Xi LP, Koutsky LA, Galloway DA, Kusters J, Hughes JP, Wheeler CM. 1997. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 89:798–802.
- Xin CY, Matsumoto K, Yoshikawa H, Yasugi T, Onda T, Nakagawa S, Yamada M, Nuzawa S, Sekiya S, Hara Y, Shimozu K, Fuji T, Takeda Y. 2001. Analysis of E6 variants of human papillomavirus type 33, 52 and 58 in Japanese women with cervical intraepithelial neoplasia/cervical cancer in relation to their oncogenic potential. *Cancer Lett* 170:19–24.
- Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart AM, Hildesheim A. 1995. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol* 69:7743–7753.
- zur Hausen H. 2002. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2:342–350.

Anexo II: Sequências nucleotídicas de novos variantes de HPV

LCR HPV-31

Bsb-36 (GenBank: FJ202000)

AGTAGTTCTGCGGTTTTGGTTTCCTGAATACTAGTTTTGGCCAACATCCTGGCTTGTAGTT
TCCTGCCTAACACACCTTGCCAACATATAATCCAGTCCAACCTTTGCAATTATAATATGAAT
CATGTTTGTAAATAACAACCTGTAGTTCAACTATGTGTCATGCACATATATTATATTGCCT
ACACACCTTAAACTGCTTTTAGGCACATATTTTGTAGCTTATCTATATCCTTGATTGCAGTG
CTGGCTTTTGACATGTTTTAACTGCCAAGGTTGTGTCATGCATTATAAATAAGTTGTATG
TACTCATATAATTAATTGCATATACGTATTACACCGTTTTCGGTTACAGTTTTACAAGCAA
TTGTTCTTTTTATACTTAATAATAATAATCTTGTATATAAAAAAGTAGGGAGTGACCGAAAT
TGGTGAACCGAAAACGGTTGGTATATAAAGCACATAGTATTTTGTGCAAACCTACAGACG
CCATGTTCAAAAATCCTGCAGAAAAG

Bsb-299 (GenBank: FJ202001)

AGTAGTTCTGCGGTTTTGGTTTCCTGAATACTAGTTTTGGCCAACATTCTGGCTTGTAGTT
TCCTGCCTAACACACCTTGCCAACATATAATCCAGTCCAACCTTTGCAATTATACTATGAAT
CATGTTTGTAAATAACAACCTGTAGTTCAACTATGTGTCATGCACATATATTATATTATCCT
ACACACCTTAAACTGCTTTTAGGCACATATTTTGTAGATTATCTATATCCTTGATTGCAGTG
CTGGCTTTTGACATGTTTTAACTGCCAAGGTTGTGTCATGCATTATAAATAAGTTGTATG
TACTCATATAATTAATTGCATATAGGTATTACACCGTTTTCGGTTACAGTTTTACAAGCA
ATTGTTCTTTTTATACTTACTAATAATAATCTTAGTATAAAAAAGTAGGGAGTGACCGAAA
GTGGTGAACCGAAAACGGTTGGTATATAAAGCACATAGTATTTTGTGCAAACCTACAGAC
GCCATGTTCAAAAATCCTGCAGAAAAGACCTCGG

E6 HPV-31

Bsb-216 (GenBank: FJ202002)

AAAAGTAGGGAGTGACCGAAAGTGGTGAACCGAAAACGGTTGGTATATAAAGCACATAG
TATTTTGTGCAAACCTACAGACGCCATGTTCAAAAATCCTGCAGAAAGACCTCGGAAATT
GCATGAACTAAGCTCGGCATTGGAATAACCTACGATGAACTAAGATTGAATTGTGTCTA
CTGCAAAGGTCAGTTAACAGAAACAGAGGTATTAGATTTTGCATTTACAGATTTAACAAT
AGTATATAGGGACGACACACCACCGAGTGTGTACAAAATGCTTAAGATTTTATTCTAA
AGTAAGTGAATTTAGATGGTATAGATATAGTGTGTATGGAACAACATTAGAAAAATTGAC
AAACAAAGGTATATGTGATTTATTAATTAGGTGTATAACGTGTCAGAGACCGTTGTGTCCA
GAAGAAAAACAAAGACATTTGGATAAAAAGAAACGATTCCACAACATAGGAGGAAGGTG
GACAGGACGTTGCATAGTATGTTGGAGAAGACCTCGTACTGAAACCCAAGTGTAACATG
CGTGGAGAAACACCTACATTGCAAGACTATGTGTTAGATTTGCAACCTGAGGCAACTGAC
CTCCACTGTTATGAGCAATTACCCGA

Bsb-233 (GenBank: FJ202003)

AAAAGTAGGGAGTGACCGAAAGTGGTGAACCGAAAACGGTTGGTATATAAAGCACATAG
TATTTTGTGCAAACCTACAGACGCCATGTTCAAAAATCCTGCAGAAAGACCTCGGAAATT
GCATGAACTAAGCTCGGCATTGGAATAACCTACGATGAACTAAGATTGAATTGTGTCTA
CTGCAAAGGTCAGTTAACAGAAACAGAGGTATTAGATTTTGCATTTACAGATTTAACAAT
AGTATATAGGGACGACACACCACCGAGTGTGTACAAAATGCTTAAGATTTTATTCAAA
AGTAAGTGAATTTAGATGGTATAGATATAGTGTGTATGGAACAACATTAGAAAAATTGAC
AAACAAAGGTATATGTGATTTGTTAATTAGGTGTATAACGTGTCAAAGACCGTTGTGTCCA
GAAGAAAAACAAAGACATTTGGATAAAAAGAAACGATTCCACAACATAGGAGGAAGGTG
GACAGGACGTTGCATAGCATGTTGGAGAAGACCTCGTACTGAAACCCAAGTGTAACATG
CGTGGAGAAACACCTACGTTGCAAGACTATGTGTTAGATTTGCAACCTGAGGCAACTGAC
CTCCACTGTTATGAGCAATTACCCGA

L1 HPV-33

Bsb-23 (GenBank: FJ202004)

CGTGCACAGGGTCATAATAATGGTATTTGTTGGGGCAATCAGGTATTTGTTACTGTGGTAG
ATACCACTCGCAGTACTAATATGACTTTATGCACACAAGTAACTAGTGACAGTACATATA
AAAATGAGAATTTTAAAGAATATATAAGACATGTTGAAGAATATGATCTACAGTTTGT
TCAACTATGCAAAGTTACCTTAACTGCAGACGTTATGACATATATTCATGCTATGAATCCA
GATATTTTAGAAGATTGGCAATTTGGTTTAAACACCTCCTCCATCTGCTAGTTTACAGGATA
CCTATAGGTTTGTACCTCTCAGGCTATTACGTGTCAAAAAACAGTACCTCCAAAGGAAAA
GGAAGACCCCTTAGGTAATATACATTTTGGGAAGTGGATTTAAAGGAAAAATTTTCAGC
AGATTTAGATCAGTTTCC

Bsb-24 (GenBank: FJ202005)

CGTGCACAGGGTCATAATAATGGTATTTGTTGGGGCAATCAGGTATTTGTTACTGTGGTAG
ATACCACTCGCAGTACTAATATGACTTTATGCACACAAGTAACTAGTGACAGTACATATA
AAAATGAAAATTTTAAAGAATATATAAGACATGTTGAAGAATATGATCTACAGTTTGT
TCAACTATGCAAAGTTACCTTAACTGCAGAAGTTATGACATATATTCATGCTATGAATCCA
GATATTTTAGAAGATTGGCAATTTGGTTTAAACACCTCCTCCATCTGCTAGTTTACAGGATA
CCTATAGGTTTGTACCTCTCAGGCTATTACGTGTCAAAAAACAGTACCTCC

Bsb-31 (GenBank: FJ202006)

CGTGCACAGGGTCATAATAATGGTATTTGTTGGGGCAATCAGGTATTTGTTACTGTGGTAG
ATACCACTCGCAGTACTAATATGACTTTATGCACACAAGTAACTAGTGACAGTACATATA
AAAATGAGAATTTTAAAGAATATATAAGACATGTTGAAGAATATGATCTACAGTTTGT
TCAACTATGCAAAGTTACCTTAACTGCAGAAGTTATGACATATATTCATGCTATGAATCCA
GATATTTTAGAAGATTGGCAATTTGGTTTAAACACCTCCTCCATCTGCTAGTTTACAGGATA
CCTATAGGTTTGTACCTCTCAGGCTATTACGTGTCAAAAAACAGTACCTCCAAAGGAAAA
GGAAGACCCCTTAGGTAATATACATTTTGGGAAGTGGATTTAAAGGAAAAATTTTCAGC
AGATTTAGATCAGTTTCC

LCR HPV-35

Bsb-121 (GenBank: FJ202007)

GGTGCCTGTTTGTGTTGTACATGGCGTGTAATGTGTGTATAATATTGTGCAATGTGTTGT
ACGTGGGTGTTTTTGTATGTATGTTGTTGTATGTATGTCAGTACGCAATAAAAGTGATGT
GTGTGTTTATAATTAACACTGTATTGTTGTATGACTATGGGTGCACCCATATGACTTACAT
AATTACAGTACACGCTATATGTTGTATATAACAATTCTACCTCCATTTTGTGTGTTGGTGTC
CTTTACATTACCTTTCAACCGATTTTCGGTTGCTGTTGGCAAGCTTTATATGTTTTTACAAA
AACATTCTACCTCAGCAGAACACTTAATCCTTGTGTTCTGATATATATTGTTTGCCAACT
TTATATTGGCTTTTGGCAATCTTTAAACTTGATTTCATCTTGCAGTATTAGTCATTTTTTATA
CTTGTGGTCCACCCACACTTGTAACTTGTAACTGCTTTTAGGCACATATTTTTTGCAT
TTCTAAAGGGCTTTAATTGCACACTTGGCTTTACATATTATGTGTGTTTGGCAACACCACCC
TACACATCCTGCCAACTTTAAGTTAAACATGCATGTAACATTACTACTGTATTACAC
ATTGTTATATGCACACAGGTGTGTCCAACCGATTTGGATTACAGTTTTATAAGC

LCR HPV-52

Bsb-15 (GenBank: FJ202008)

CCATTGTCTGTTGGGTAATTGTCTGTGTCATGTATGTGTTGTGTATGTCAAAAAACAGGTTA
AAAGGTAACCAATTGTTTGTATGTAATTGTTTTCTGTGTGTACTGTGTTGTTTGCATGTTAT
GTATGTGTGTGTCATGTTTGTGATTTGTCAGTTCCTGTATGTATGTTTTGTGTATGTATT
AATAAAGTACTGTATTTACTAACTATTTATAGTAGTCTTATTGTATGGTTGCACCCACAT
GAGTAACAATACAGTTGCTTCTAATCTATTGCATCTCCTGCCCTACCCTGTGTCCCCTGCC
TACCCTGTGCTACTTTGTTACACTACTAATTAGCCTTATACTCTCCATTTTGTACCATTTT
GTACTATCCACCAATTTTAAATCCTAACCGAATTCGGTTGGTGTGGCACCCTTTGGTTGTC
CTTGGCACAGTAACAATTTTTATATAAATGTCAGCAAACCTGCTTAATCCTTTGGTTTCC
TGCAGTCCACTGGTCTACACTTGTGTCCTGCTAAACTGATGTCCCCTAAACTGACTC
ACACTCCTGCAGTGCAGCTAAACAATACATTGCCTAACATTGCATGTTTTAACTGCTTTT
AGGCACATATTTTATTTAACTTTCAATGCACTAATTACAGTGTGGCTTACACAAGTACA
TCTACGCCAAATATGTCTTGTAACATAAATTGAATACTGTTACTCACCAGGTGTGCACT
ACACGACCGGTTACGGTTACCGTAGCCACAACCCTTTTGTATAAATTATAAATTATAAT

CTTATACTAGTAAAAAGTAGGGTGTAAACCGAAAACGGTCAGACCGAAACCGGTGTATATA
TATAGAACACAGTGTAGCTAACGCACGGCC

L1 HPV-52

Bsb-20 (GenBank: FJ202009)

ATAATGGCATATGTTGGGGCAATCAGTTGTTGTACAGTTGTGGATACCACTCGTAGCAC
TAACATGACTTTATGTGCTGAGGTTAAAAAGGAAAGCACATATAAAAATGAAAATTTTAA
GGAATACCTTCGTCATGGCGAGGAATTTGATTTACAATTTATTTTTCAATTGTGCAAAATT
ACATTAACAGCTGATGTTATGACATACATTCATAAGATGGATGCCACTATTTAGAGGACT
GGCAATTTGGCCTTACCCACCACCGTCTGCATCTTTGGAGGACACATACAGATTTGTAC
TTGTACTGCTATAACTTGTCAAAAAACACACCACCTAAAGGAAAGGAAGATCCTTTAAA
GGACTATATGTTTTGGGAGGTGGATTTAAAAGAAAAGTTTTCTGCAGATTTAGATCAGTTT
CC

LCR HPV-58

Bsb-295 (GenBank: FJ202010)

TTGTTGTGGTACTTACACTATTTTATTATACATGTTTGTGTTTATGTATGTGTTGTCTGT
TTGTTTATGTTTGTGTATATGTTGTATGTGTTATGTGTCATGTTTGTGTACATGTTCTATGTC
TTTGTACAGTTTCCTGTTTCTGTATATATGTAATAAACTATTGTGTGTATTGTAAACTATTTG
TATTGTTTGGGTGTATCTATGAGTAAGGTGCTGTCCCTAAATGGCCCTACCCTGCCCTGCCT
ATTATGCATACCTATGTAATAGTATTTGTATGATATGTATTTTATAGTTTTTAAACAGTACTG
CCTCCATTTTACTTTACCTCCATTTTGTGCATGTAACCGATTTCCGGTTGCTGGCACAAACGT
GTTTTTTTTAAACTACAATTTAAACAATACAGTTAATCCTTTCCCTTCCTGCCTGCTTTTGT
CCTATACTTGCATATGTGACTCATATATACATGCAGTGCAGTTGCAAAAATGTTTAATTATA
CTCATAGTTTTAAACATGCTTATAGGCACATATTTTAACTTACTTTCAATGCTTAAGTGCAGT
TTTGGCTTGCACAATGGTTTGTATGCCAAACTATGTCTTGTA AAAAGTGACTCACTAACAT
TTATTGCCAGGTGTGGACTAACCGTTTTAGGTCACATTGTTTCATGTTTCAACATTTTATATA
ATACTAAACTATAATGCCAAATCTTGTA AAAACTAGGGTGTAAACCGAAAACGGTCTGACC
GAAACCGGTGCATATATAAAGCAGACATTTTTTGGTAGGCTACTGCAGGACT

Bsb-329 (GenBank: FJ202011)

TTGTTGTGGTACTTACACTATTTTATTATACATGTTTGTGTTTATGTATGTGTTGTCTGT
TTGTTTATGTTTGTGTATATGTTGTATGTGTTATGTGTCATGTTTGTGTACATGTTCTATGTC
TTTGTACAGTTTCCTGTTTCTGTATATATGTAATAAACTATTGTGTGTATTGTAAACTATTTG
TATTGTTTGGGTGTATCTATGAGTAAGGTGCTGTCCCTAAATGGCCCTACCCTGCCCTGCCT
ATTATGCATACCTATGTAATAGTATTTGTATGATATGTATTTTATAGTTTTTAAACAGTACTG
CCTCCATTTTACTTTACCTCCATTTTGTGCATGTAACCGATTTCCGGTTGCTGGCACAAACGT
GTTTTTTTTAAACTACAATTTAAACAATACAGTTAATCCTTTCCCTTCCTGCCTGCTTTTGT
CCTATACTTGCATATGTGACTCATATATACATGCAGTGCAGTTGCAAAAATGTTTAATTATA
CTCATAGTTTTAAACATGCTTATAGGCACATATTTTAACTTACTTTCAATGCTTAAGTGCAGT
TTTGGCTTGCACAATGGTTTGTATGCCAAACTATGTCTTGTA AAAAGTGACTCACTAACAT
TTATTGCCAGGTGTGGACTAACCGTTTTGGGTCACATTGTTTCATGTTTCAACATTTTATATA
ATACTAAACTATAATGCCAAATCTTGTA AAAACTAGGGTGTAAACCGAAAACGGTCTGACC
GAAACCGGTGCATATATAAAGCAGACATTTTTTGGTAGGCTACTGCAGGACT

Bsb-367 (GenBank: FJ202012)

TTGTTGTGGTACTTACACTATTTTATTATACATGTTTGTGTTTATGTATGTGTTGTCTGT
TTGTTTATGTTTGTGTATATGTTGTATGTGTTATGTGTCATGTTTGTGTACATGTTCTATGTC
TTTGTACAGTTTCCTGTTTCTGTATATATGTAATAAACTATTGTGTGTATTGTAAACTATTTG
TATTGTTTGGGTGTATCTATGAGTAAGGTGCTGTCCCTAAATGGCCCTACCCTGCCCTGCCT
ATTATGCATACCTATGTAATAGTATTTGTATGATATGTATTTTATAGTTTTTAAACAGTACTG
CCTCCATTTTACTTTACCTCCATTTTGTGCATGTAACCGATTTCCGGTTGCTGGCACAAACGT
GTTTTTTTTAAACTACAATTTAAACAATACAGTTAATCCTTTCCCTTCCTGCCTGCTTTTGT
CCTATACTTGCATATGTGACTCATATATACATGCAGTGCAGTTGCAAAAATGTTTAATTATA
CTCATAGTTTTAAACATGCTTATAGGCACATATTTTAACTTACTTTCAATGCTTAAGTGCAGT
TTTGGCTTGCACAATGGTTTGTATGCCAAACTATGTCTTGTA AAAAGTGACTCACTAACAT
TTATTGCCAGGTGTGGACTAACCGTTTTGGGTCACATTGTTTCATGTTTCAACATTTTATATA

ATACTAAACTATAATGCCAAATCTTGTA AAAACTAGGGTGTAACCGAAAACGGTCTGACC
GAAACCGGTGCATATATAAAGCAGACATTTTTTGGTAGGCTACTGCAGGACT