LIOT ECA

UTO DE QUÍMICA
IDADE DE SÃO PAULO

BIBLIOTECAR
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

Universidade de São Paulo

Instituto de Química

17 de Novembro de 2001

vide

NÃO LUCAS

25784

1288468

INTERAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DE GENES HLA DE
CLASSE II E VARIANTES DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO TIPO 16
NO RISCO DE CARCINOMA DO COLO UTERINO.

Patrícia Savio de Araújo Souza

Dissertação de Mestrado

Orientadora: Dra. Luisa Lina Villa

São Paulo

9 de novembro de 2001

DEDALUS - Acervo - CQ

30100004925

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

S729i Souza, Patrícia Savio de Araújo
Interação entre o polimorfismo de genes HLA de classe II
e variantes de papilomavírus humano tipo 16 no risco de
carcinoma do colo uterino / Patrícia Savio de Araújo Souza. --
São Paulo, 2001.
105p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Villa, Luisa Lina

1. Virologia 2. Vírus : Doenças : Aspectos imunológicos :
Medicina 3. Câncer : Útero cérvix : Medicina I. T. II.
Villa, Luisa Lina, orientador.

576.64 CDD

**“Interações entre o Polimorfismo de Genes HLA de
Classe II e Variantes de Papilomavírus Humano Tipo 16
no Risco de Carcinoma do Colo Uterino”**

PATRÍCIA SAVIO DE ARAÚJO SOUZA

*Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências - Área:
Bioquímica.*

Aprovada por:

Profa. Dra. LUISA LINA VILLA
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. BETTINA MALNIC
IQ - USP

Prof. Dr. ROGER CHAMMAS
FM - USP

SÃO PAULO
09 DE NOVEMBRO 2001.

*Aos meus pais,
Cleide e Pedro.*

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, ao Dr. Ricardo Renzo Brentani pela oportunidade de estar no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer. Agradeço também a todos os funcionários e estudantes deste instituto, pela ajuda em todas as horas.

À Pós-Graduação do Instituto de Química da USP.

A Dra. Luisa Lina Villa, por me deixar participar de seu grupo de pesquisa e me aventurar numa nova linha de pesquisa. Obrigada pela confiança.

Ao Paulo Cesar Maciag, impossível esquecer, pelo apoio profissional e, acima de tudo, por ser minha mãe aqui em São Paulo.

Àqueles que me agüentaram no dia-a-dia é fundamental agradecer, pois me ajudaram em tantas questões, na bancada e fora dela: a todos os componentes do grupo de Virologia.

Aos responsáveis pelo meu ingresso nessa área, Dra. Maria Luiza Petzl-Erler e Dr. Marcello Iacomini.

E por falar em família, gostaria de agradecer a todos do LabRI, pois além da ajuda profissional, tornaram meus dias paulistas (deveria dizer mineiros?) bem mais divertidos.

Aos que mais me ouviram e ajudaram, em todas as horas: à minha família (agora a de verdade, a de Curitiba!) e aos meus amigos, sem o apoio dos quais eu já teria desistido, ou talvez nem tivesse me arriscado...

A todos àqueles que passaram ou permaneceram na minha vida e contribuíram para que este objetivo fosse alcançado.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro;

Muito obrigada.

Se este trabalho é digno de algum mérito, ele é de cada um de vocês.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABELAS.....	4
LISTA DE ABREVIATURAS	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1. Carcinoma do Colo Uterino.....	8
1.1.1. Epidemiologia.....	8
1.1.2. Etiopatologia.....	9
1.1.3. Fatores de Risco.....	9
1.2. Papilomavírus Humano	10
1.2.1. Associação com Carcinoma do Colo Uterino.....	10
1.2.2. Infecção.....	12
1.2.3. Biologia.....	13
1.2.4. Variantes	17
1.3. Resposta Imune às Infecções Virais.....	24
1.3.1. Papel das Moléculas HLA	26
1.3.2. Moléculas HLA de Classe I.....	29
1.3.3. Moléculas HLA de Classe II	32
1.3.4. Resposta Imune às Infecções por HPV e ao Carcinoma do Colo Uterino.....	35
1.4. Associação entre HLA e Carcinoma do Colo Uterino.....	37
2. OBJETIVOS.....	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1. Amostras	40
3.2. Detecção e tipagem de HPV.....	41
3.3. Tipagem de HLA	42
3.4. Tipagem das Variantes de HPV-16.....	42
3.4.1. Reação de amplificação do gene E6	43
3.4.2. Reação de amplificação do gene L1	44
3.4.3. Preparo das Membranas	45
3.4.4. Hibridação.....	47
3.4.5. Análise Estatística	50
4. RESULTADOS	52
4.1. Variantes de HPV-16.....	52

4.2. Análise de HLA em CCU e Controles.....	59
4.2.1. Análise de Ramos de Variantes de HPV-16.....	59
4.2.2. Análise da posição nucleotídica 350 do gene E6 de HPV-16	72
5. DISCUSSÃO.....	74
6. CONCLUSÕES.....	92
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENOMA DO HPV-16.....	16
FIGURA 2: ÁRVORE FILOGENÉTICA DE HPV-16 CONSTRUÍDA A PARTIR DE 301 ISOLADOS DE 25 GRUPOS ÉTNICOS E/OU REGIÕES GEOGRÁFICAS.	20
FIGURA 3: MAPA SIMPLIFICADO DO MHC HUMANO.....	28
FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE MOLÉCULAS HLA DE CLASSES I E II.....	30
FIGURA 5: ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DOS GENES HLA-DR E PRODUTOS CODIFICADOS.	33
FIGURA 6: AUTORADIOGRAMAS DE MEMBRANAS SUBMETIDAS À HIBRIDAÇÃO COM OS OLIGONUCLEOTÍDEOS-SONDA 350T E 350G, COMPLEMENTARES AO GENE E6 DE HPV-16.	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DOS GENES E6 E L1.....	46
TABELA 2: SONDAS COMPLEMENTARES AOS GENES L1 E E6 PARA TIPAGEM DAS VARIANTES MOLECULARES DE HPV-16.....	49
TABELA 3: ALTERAÇÕES DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS ENCONTRADAS EM E6 NAS VARIANTES MOLECULARES DE HPV-16.....	54
TABELA 4: VARIAÇÕES NAS SEQÜÊNCIAS DO GENE E DA PROTEÍNA L1 NAS VARIANTES MOLECULARES DE HPV-16.....	55
TABELA 5: DISTRIBUIÇÃO DAS VARIANTES MOLECULARES DE HPV-16 ENCONTRADAS NAS AMOSTRAS DE CCU.	57
TABELA 6: GRUPOS SOROLÓGICOS DE HLA-DRB1 E ALELOS EM CASOS E CONTROLES.	61
TABELA 7: GRUPOS SOROLÓGICOS DE HLA-DQB1 E ALELOS EM CASOS E CONTROLES.	62
TABELA 8: NÚMERO DE PORTADORES E FREQUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS HLA-DRB1-DQB1 EM CASOS DE CCU POSITIVOS PARA VARIANTES DE HPV-16 E CONTROLES.	63
TABELA 9: OR E IC 95% PARA CCU PORTADORES DE VARIANTES EUROPÉIAS DE ACORDO COM GRUPOS HLA.....	65
TABELA 10: OR E IC 95% PARA CCU PORTADORES DE VARIANTES NÃO-EUROPÉIAS DE ACORDO COM GRUPOS HLA.....	66
TABELA 11: OR E IC 95% PARA CCU POSITIVOS PARA VARIANTES DE HPV-16 ASIÁTICO-AMERICANAS DE ACORDO COM GRUPOS HLA.	69
TABELA 12: OR E IC 95% PARA CCU POSITIVOS PARA VARIANTES DE HPV-16 AFRICANAS DE ACORDO COM GRUPOS HLA.....	71
TABELA 13: OR E IC 95% PARA CCU POSITIVOS PARA VARIANTES DE HPV-16 PORTADORAS DE 350T(LEU) E 350G(VAL) DE E6 DE ACORDO COM GRUPOS HLA.	73

LISTA DE ABREVIATURAS

APC: *Antigen Presenting Cell*; célula apresentadora de antígeno

APL: *Altered Peptide Ligands*; ligantes peptídicos alterados

CCU: Carcinoma do colo uterino

CTL: *Cytotoxic T Lymphocyte*; linfócito T citotóxico

HLA: *Human Leukocyte Antigen*; antígenos leucocitários humanos

HPV: *Human Papillomavirus*; papilomavírus humano

AA: *Asian-American variant*; variante (de HPV-16) asiático-americana

E: *European variant*; variante (de HPV-16) européia

NE: *Non European variant*; variante (de HPV-16) não européia

AF: *African variant*; variante (de HPV-16) africana

IFN: Interferon

IL: Interleucina

MHC: *Major Histocompatibility Complex*; Complexo Principal de Histocompatibilidade

NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

OR: *Odds Ratio*; razão de chance

ORF: *Open Reading Frame*; região codificadora em potencial

PB: Pares de bases

PCR: *Polymerase Chain Reaction*; reação em cadeia da polimerase

SSO: *Sequence Specific Oligonucleotide-probe*; oligonucleotídeo-sonda de sequência específica

TCR: *T Cell Receptor*; receptor da célula T

TNF: *Tumor Necrosis Factor*; fator de necrose tumoral.

RESUMO

O carcinoma do colo uterino é um dos tumores mais freqüentes entre as mulheres e o principal fator de risco para o desenvolvimento desta neoplasia é a infecção persistente por tipos de papilomavírus humano (HPV) de alto risco oncogênico. Dentre estes, o HPV-16 é o mais comumente encontrado em lesões de alto grau e carcinoma. HPV cujas seqüências nucleotídicas diferem em até 2% são classificados como variantes de um mesmo tipo, e algumas destas variações genômicas levam a mudanças de aminoácidos em proteínas virais, em regiões potencialmente antigênicas. Além de variações antigênicas, o polimorfismo das moléculas HLA de classe II, responsáveis pela apresentação de antígenos às células T, também pode influenciar a resposta imune. Alguns estudos já descreveram associações entre alelos HLA e risco de câncer do colo do útero e infecção pelo HPV. Este projeto visa avaliar se existem diferenças na distribuição de alelos HLA entre pacientes com carcinoma do colo uterino portadoras de diferentes variantes de HPV-16 e mulheres sem câncer. Foram utilizados 112 casos de carcinoma do colo do útero positivos para presença de DNA de HPV-16 e 257 controles. Em todas as amostras do estudo foram realizadas as tipagens dos genes HLA-DRB1 e DQB1. A caracterização dos genes E6 e L1 de variantes de HPV-16 foi realizada nos 112 casos através de PCR-SSO e permitiu a identificação de infecções por uma única variante de HPV-16 em 89 amostras. Dentre elas foram encontradas variantes européias, asiático-americanas e africanas. A magnitude da associação entre os grupos HLA e as variantes de HPV-16 foi estimada através do cálculo de *Odds Ratio* e respectivo intervalo de confiança de 95%. Uma associação negativa entre DQB1*05 e câncer do colo do útero portadores de HPV-16 foi descrita anteriormente nesta amostra. Nosso estudo mostrou que esta associação pode ser atribuída às portadoras de variantes não-européias. A associação positiva de DRB1*15 mostrou ser maior entre portadoras de variantes européias que não-européias. Apesar do pequeno número de casos portadores de variantes africanas, foram encontradas associações positivas com DRB1*0701 e DQB1*0201. O polimorfismo da posição 350 do gene E6, descrito anteriormente como associado a risco de persistência de HPV, também foi avaliado: entre portadores de 350T, que codifica o aminoácido leucina, encontrou-se um efeito protetor dos alelos DRB1*04 e DQB1*0302. Uma maior freqüência de DRB1*15 foi observada entre portadores de variantes 350T quando comparada à freqüência nos controles. Nossos resultados sugerem que a associação entre alelos HLA de classe II e risco de câncer do colo do útero é influenciada pela distribuição de variantes de HPV-16 numa população determinada.

ABSTRACT

Cervical cancer is one of the most frequent tumor among women and the major risk factor for the development of this neoplasia is persistent infection with high risk oncogenic types of human papillomavirus (HPV). Among these, HPV-16 is the commonest type found in high grade lesions and carcinoma. HPV with less than 2% of divergence in nucleotide sequence are classified as variants of a given type, and these genomic variations can lead to changes in potentially antigenic regions. Besides these antigenic variations, polymorphism of HLA class II molecules, responsible for antigen presentation to T cells, can also influence the immune response. Several studies showed associations between HLA class II polymorphism and risk of cervical cancer and HPV infection. The aim of this study is to investigate if there are differences in the HLA class II alleles distribution between women with invasive cervical cancer (ICC) that harbor different HPV-16 variant and women without cancer. We analyzed 112 HPV-16 positive cases of cervical carcinoma and 257 controls. All the samples had their HLA-DRB1 and DQB1 genes previously typed. HPV-16 variants in 112 ICC samples were characterized for E6 and L1 genes by PCR-SSO and allowed the identification of infections by single variants in 89 samples. European, Asian-American and African variants were found. The magnitude of association between HLA markers and HPV-16 variants was measured by Odds Ratios (OR) and respective 95% confidence intervals (CI). A negative association between DQB1*05 and HPV-16 positive ICC was previously described in this sample. Our study showed that it may be attributed to non-European variants carriers. The positive association of DRB1*15 was higher for women harboring European than non-European variants. In spite of the small number of women carrying African variants, positive association was found with DRB1*0701-DQB1*0201. The E6 gene polymorphism at residue 350, previously described as associated with risk of HPV persistence, was also investigated: among ICC carrying 350T, that code for leucine, we found a protective effect of DRB1*04-DQB1*0302 haplotype. A higher frequency of DRB1*15 was found among carriers of 350T variants as compared to controls. Our results suggest that the association between HLA class II polymorphism and risk of invasive cervical cancer is influenced by the distribution of HPV-16 variants in a given population.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Carcinoma do Colo Uterino

1.1.1. Epidemiologia

O carcinoma de colo uterino é uma das principais causas de morte entre mulheres de países em desenvolvimento, sendo os países do Sudeste asiático, América do Sul e África os que apresentam as maiores taxas de incidência: acima de 30/100.000 mulheres por ano (IARC, 2001). No Brasil, esta é a terceira neoplasia mais incidente entre as mulheres, depois apenas de câncer de pele (excluídos os melanomas) e mama (INCA, 2000). A mais alta taxa de incidência desta neoplasia, de 83/100.000 mulheres por ano, é encontrada na cidade de Recife (FRANCO, 1994).

No ano de 1998, esta neoplasia foi responsável por 3639 mortes no Brasil. São esperados 16.270 casos novos de carcinoma do colo uterino (CCU) e 3.750 óbitos para 2001, que correspondem às taxas brutas de incidência e mortalidade de 18,86 e 4,31 por 100.000 mulheres, respectivamente (INCA, 2000). No entanto, estes números podem estar subestimados.

1.1.2. Etiopatologia

As alterações do epitélio do colo do útero que antecedem o carcinoma do colo uterino são designadas neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC). Para uniformizar a nomenclatura, o comitê da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), reunido em 1961 na cidade de Viena, designou o termo displasia como “lesão do epitélio em que ocorrem anomalias de maturação”. A denominação NIC I é utilizada nos casos de displasia leve, diferenciada, em que apenas as camadas profundas do epitélio apresentam anormalidades e NIC II, nos casos de displasia moderada, em que a lesão acomete mais da metade do epitélio. O termo NIC III equivale ao carcinoma *in situ*: displasia indiferenciada, em que quase toda altura do epitélio apresenta células atípicas, porém sem a invasão do estroma, alteração esta que caracteriza o carcinoma invasivo do colo uterino (FOCCHI e MARTINS, 1994).

1.1.3. Fatores de Risco

O carcinoma de cérvix uterina comporta-se epidemiologicamente como uma doença sexualmente transmissível. Entre os fatores de risco para o desenvolvimento deste tipo de câncer e de suas lesões precursoras estão o número de parceiros sexuais, início precoce de vida sexual, tabagismo, baixo nível sócio-econômico (SCHIFFMAN *et al.*, 1993) e uso de contraceptivos orais (HILDESHEIM *et al.*, 1990). No entanto, a infecção pelo Papilomavírus Humano

(HPV) é considerada como o principal fator de risco para o desenvolvimento desta neoplasia (SCHIFFMAN *et al.*, 1993; FRANCO, 1995).

1.2. Papilomavírus Humano

1.2.1. Associação com Carcinoma do Colo Uterino

Dentre os mais de 90 genótipos descritos, aproximadamente 40 infectam especificamente mucosas e a região anogenital e destes, poucos são encontrados em biópsias de cânceres anogenitais. Estes mesmos tipos de HPV também são encontrados em aproximadamente 20% das biópsias de câncer da região orofaríngea.

Os HPV são classificados segundo o risco que conferem ao desenvolvimento de lesões neoplásicas malignas. Os tipos de baixo risco (HPV 6, 11, 42, 43 e 44) são mais freqüentes em verrugas genitais externas (condiloma acuminado) e lesões benignas do colo uterino. Os tipos de alto risco (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52 e 56) são encontrados principalmente em lesões intra-epiteliais de alto grau e no carcinoma invasor do colo uterino (LOWY *et al.*, 1994).

A porcentagem de detecção do DNA de HPV em tumores de colo uterino varia entre 80 e 100% nos diversos estudos publicados. Em casos de NIC, varia entre 50 e 90% (BOSCH *et al.*, 1995; PASETTO *et al.*, 1992). Esta variação pode ser atribuída, em parte, aos diferentes métodos de detecção utilizados em cada estudo. Métodos baseados na amplificação do sinal, como PCR, têm sido aceitos como os mais sensíveis e específicos na detecção e tipagem de HPV (BOSCH *et*

al., 1997). A maioria destes estudos utiliza primers que têm como alvo fragmentos do gene viral L1. No entanto, esta estratégia pode levar a uma subestimativa, pois eventos de integração do genoma viral podem afetar a estrutura do gene em questão. Por isso, WALBOOMERS *et al.*, (1999) testaram por PCR, em amostras negativas para L1, outros genes virais como E7 e E1. Esta análise permitiu a detecção do DNA de HPV em 99,7% das amostras adequadas de tumores cervicais.

Outra fonte de variação na detecção de HPV é a qualidade das amostras: estudos em que se utilizam biópsias cervicais geralmente apresentam maiores taxas de positividade que estudos utilizando células esfoliadas. Erros de classificação na citologia oncológica também podem contribuir para as variações encontradas. Estudos realizados em diferentes populações, utilizando as mesmas técnicas para detecção de HPV, sugerem que as diferenças nas prevalências podem decorrer de diferenças no comportamento sexual de cada população (BOSCH *et al.*, 1994; CASTELLSAGUÉ *et al.*, 1997).

1.2.2. Infecção

O DNA do HPV é detectado em 10 a 50% de mulheres assintomáticas em idade reprodutiva (FRANCO, 1991; SCHIFFMAN *et al.*, 1993). O HPV-16 é o tipo mais comumente encontrado, estando presente em 30% das amostras com citologia normal e portadoras de HPV (BAUER *et al.*, 1991; VAN DEN BRULE *et al.*, 1990). Sua prevalência entre pacientes com lesões neoplásicas varia de acordo com o estudo, estando entre 50 (MUÑOZ e BOSCH, 1996) e 84% (BAUER *et al.*, 1991; VAN DEN BRULE *et al.*, 1990) dos tumores.

A infecção pelo HPV é necessária, porém não suficiente para o desenvolvimento do carcinoma do colo uterino, desta forma, apenas uma pequena fração das mulheres infectadas com HPV de alto risco desenvolvem lesões neoplásicas do colo uterino. Mulheres que apresentam infecção persistente com HPV de alto risco, além de uma carga viral alta, estão sob um risco maior de desenvolverem neoplasia de cérvix uterina (VILLA, 1997).

A infecção anogenital por HPV é preferencialmente transmitida pelo contato sexual, e a incidência é mais elevada em mulheres jovens, na faixa etária entre 22 e 25 anos (SCHIFFMAN, 1992). A infecção genital por HPV de alto risco confere um risco relativo em torno de 50 para o desenvolvimento de câncer cervical (SCHIFFMAN *et al.*, 1993).

Os HPV infectam as células basais do epitélio, sendo seu acesso através de microlesões pré-existentes. As infecções permissivas constituem o ciclo produtivo clássico como de outros vírus de DNA: após a adsorção e penetração, com a diferenciação das células do epitélio, o vírus utiliza fatores e maquinaria celulares para sua transcrição, tradução e replicação, dando origem a novos vírus nas

camadas mais diferenciadas. O genoma viral é mantido no estado episomal no núcleo das células normais infectadas, entretanto, está integrado no genoma celular na maioria das células tumorais (revisado por VILLA, 1997).

1.2.3. Biologia

Os papilomavírus humanos constituem um grupo de vírus hospedeiro-específicos, epiteliotrópicos, pertencentes a família Papillomaviridae, gênero *Papillomavirus* (VAN REGENMORTEL *et al.*, 1999).

Os HPV têm diâmetro entre 55 e 60nm, apresentado sob a forma de partículas icosaédricas não envelopadas de simetria pentagonal, constituídas por 72 unidades denominadas capsômeros (ZHOU e FRAZER, 1996).

Seu genoma consiste numa fita dupla circular de DNA, com aproximadamente 8000 nucleotídeos, divididos em três segmentos (Figura 1). A região E (*Early*) com 6 genes; a região L (*Late*), com os genes L1 e L2 que codificam as proteínas principal e secundária do capsídio, respectivamente; e uma região não codificadora, a LCR (*Long Control Region*), de 900pb, responsável pelo controle da expressão gênica e replicação viral (VILLA, 1997).

A LCR, constituída de aproximadamente 1.000 pb, está dividida em 3 segmentos funcionais: o 5' distal, o central e o 3' terminal. A região central é denominada intensificadora de transcrição (*enhancer*), e alvo de muitos dos fatores celulares que, assim como fatores virais, regulam a expressão viral. Dentre os fatores de transcrição celulares que se ligam a LCR estão: AP-1, Oct-1, SP-1 e YY-

1 (revisado por O'CONNOR *et al.*, 1995). O promotor dos genes precoces E6 e E7 encontra-se na região 3' LCR.

A proteína E1 apresenta função de helicase, que forma um complexo com E2, uma proteína reguladora da transcrição viral (ANDROPHY, 1994). Os produtos dos genes E1 e E2, em conjunto com fatores celulares, atuam tanto na regulação da expressão quanto na replicação viral. A linearização do genoma viral, a qual antecede a integração deste no genoma celular nos casos de NIC e CCU, freqüentemente ocorre na região destes genes, desregulando sua função e, conseqüentemente, sua expressão.

Apesar de sua localização, o gene E4 é de expressão tardia e seu produto parece estar envolvido na maturação e liberação das partículas virais (VILLA, 1997). O gene E5 é bastante expresso em lesões precursoras de baixo grau e sua função parece estar relacionada aos estágios precoces da infecção pelo HPV (revisado por ZUR HAUSEN, 1996).

Os genes de expressão tardia L1 e L2 codificam as proteínas principal e secundária do capsídeo viral, respectivamente, e contêm as seqüências mais conservadas entre os papilomavírus (BERNARD *et al.*, 1994), unicamente expressas em infecções produtivas nos queratinócitos diferenciados.

Os produtos dos genes E6 e E7 são transcritos pelo promotor P97 e originam um RNA policistrônico. Nos tipos de alto risco, estas proteínas, que interferem na regulação do ciclo celular, estão envolvidas com o processo de transformação, sendo capazes de transformar células primárias na presença de oncogenes ativos e imortalizar células humanas (MATLASHEWSKI *et al.*, 1988; SCHLEGEL *et al.*, 1988; VILLA, 1997).

A proteína E6, principalmente de HPVs de alto risco, promove a degradação da proteína celular P53, produto do gene supressor tumoral p53 (WERNESS *et al.*, 1990), através da via dependente de ubiquitina (SCHEFFNER *et al.*, 1990 e 1993). Foram identificadas outras proteínas celulares capazes de interagir com E6 (revisado por RAPP & CHEN, 1998), mas o papel destas interações ainda não foi totalmente esclarecido.

Outro produto de gene supressor tumoral, a proteína pRB, é inativada por E7 (DYSON *et al.*, 1989), e esta inativação leva a liberação dos fatores de transcrição E2F. A proteína E7 de HPVs se liga também a outras proteínas que atuam na regulação do ciclo celular. A proteína E7 de HPVs de alto risco como 16 e 18 se liga à pRB com maior afinidade que aquelas de HPVs de baixo risco como 6 e 11 (revisado por ZUR HAUSEN, 1996).

Figura 1: Representação esquemática do genoma do HPV-16.

1.2.4. Variantes

Os HPV são classificados de acordo com o grau de identidade na sequência de DNA das regiões E6, E7 e L1. Diferenças superiores a 10%; caracterizam tipos diferentes; subtipos são aqueles cuja variação da sequência é de 10% a 2%; e são classificadas como variantes de um tipo, vírus cujas diferenças nucleotídicas são menores que 2% da sequência destes genes (VAN RANST *et al.*, 1996).

Em 1991, HO *et al.* estudaram a variabilidade genômica intratípica do HPV-16, através do sequenciamento de um fragmento da LCR correspondente ao *enhancer* de transcrição, em amostras de biópsias e esfregaços cervicais de mulheres de Cingapura e do Brasil. A escolha desta região genômica foi fundamentada nas variações de sequência já descritas na LCR de diferentes tipos, sem levar a perda de função, diferente de regiões codificadoras, em que mutações mais freqüentemente levam a perda de função do gene e são eliminadas. Neste estudo foram encontradas 11 variantes de HPV-16 em Cingapura e 12 em amostras brasileiras, 5 destas comuns às duas coortes. A construção de uma árvore filogenética sugeriu que as variantes coevoluíram com a espécie humana. Em 1992, o estudo foi ampliado, incluindo amostras cervicais, vulvares e de biópsias penianas de Cingapura, Brasil, Alemanha e Tanzânia (CHAN *et al.*, 1992). A análise desta nova árvore filogenética sugeriu que a evolução do HPV-16 foi separada por um longo período de tempo na África e Eurásia, e que estas variantes foram trazidas para o Brasil, pois as variantes da Tanzânia ficaram restritas aos ramos africanos, enquanto as da Alemanha, assim como a maioria das de Cingapura, foram restritas ao ramo da Eurásia. As variantes encontradas no Brasil foram divididas entre os dois ramos. Em 1993, um estudo ainda maior foi realizado,

compreendendo 301 isolados de 25 diferentes grupos étnicos ou regiões geográficas (HO *et al.*, 1993). Novamente foi analisado o fragmento do *enhancer* da LCR. As 48 variantes identificadas foram agrupadas em 5 ramos principais, sendo 2 deles praticamente confinados a África: ramos africano-1 (Af-1) e africano-2 (Af-2); um deles com as variantes encontradas na Europa (ramo europeu), as quais foram também encontradas em menor frequência em outras regiões; outro ramo específico com isolados chineses e japoneses (ramo asiático) e o quinto ramo, composto de um menor número de variantes asiáticas e de isolados indígenas (ramo asiático-americano) (Figura 2).

Além da LCR, a variação intratípica do HPV-16 foi também investigada nas ORFs de E6, L2 e L1 em 29 isolados dos Estados Unidos (YAMADA *et al.*, 1995). Esta análise revelou a alta variabilidade de L2, e uma maior variação de E6 na sua região amino terminal. Em seguida, foi realizado um estudo incluindo 408 espécimes isolados de tumores cervicais de 22 países de 5 continentes, que analisou variantes nos genes E6 e L1 (YAMADA *et al.*, 1997). Através da metodologia de hibridação foram encontradas 32 variantes não descritas. O padrão obtido com o gene E6 classificou a maioria das variantes encontradas em amostras da Europa e América do Norte como pertencentes ao ramo europeu, e aquelas encontradas na África, primariamente dos ramos Af-1 e Af-2. Variantes do ramo asiático (As) foram identificadas no Sudeste asiático e variantes AA foram encontradas nas Américas Central e do Sul, e Espanha.

Estudos funcionais e de investigação do significado biológico desta variação intratípica também foram realizados: a análise de 3 coortes por XI *et al.* (1995) revelou um padrão predominante entre as amostras HPV-16 positivas, fato que levantou diferentes hipóteses de explicação, como por exemplo, uma vantagem

biológica das variantes, ou a interação com fatores do hospedeiro. Este estudo utilizou-se da análise de variantes de HPV-16 e demonstrou a persistência de uma variante principal em amostras ao longo do tempo. A variabilidade intratípica de HPV-16 foi utilizada em outros estudos de persistência do genoma viral. Num estudo realizado pelo nosso grupo (VILLA *et al.*, 2000), analisando a LCR e os genes E6 e L1, as variantes não-européias foram detectadas mais freqüentemente nos casos de persistência e associadas a lesão de alto grau quando comparadas às européias. Outro estudo (XI *et al.*, 1997) sugeriu um risco diferencial de desenvolvimento de NIC II e III entre variantes, sendo maior para variantes não-protótipo quando comparadas as protótipo. A variante protótipo foi encontrada no primeiro isolado de um carcinoma do colo uterino HPV-16 positivo seqüenciado (SEEDORF *et al.*, 1985) e pertence ao ramo europeu. Apesar desta denominação, o termo protótipo não tem relação com origem ancestral do HPV-16.

Figura 2: Árvore filogenética de HPV-16 construída a partir de 301 isolados de 25 grupos étnicos e/ou regiões geográficas.
(Segundo HO *et al.*, 1993).

Um estudo de ZEHBE *et al.* (1998a) realizado na população sueca demonstrou uma maior frequência de variantes em relação ao protótipo, entre pacientes com CCU, e uma distribuição equilibrada entre pacientes com NIC III. A variação mais frequente foi na posição nucleotídica 350 do gene E6: a substituição de um T por um G levando a troca de uma leucina por uma valina na proteína E6 (L83V), detectada em 88% dos casos de CCU e apenas 44% de NIC III, enquanto E7 não apresentou grandes variações. Um estudo prévio mostrou que a presença do nucleotídeo G nesta posição estava associada à persistência viral (LONDESBOROUGH *et al.*, 1996).

Resultados semelhantes aos de ZEHBE *et al.*, (1998a) foram descritos por XI *et al.* (1997) na população americana. O estudo sugeriu que o risco de desenvolvimento de NIC II e III é maior para variantes não-protótipo. No entanto, posteriormente (ZEHBE *et al.*, 1998b) os dados da população sueca foram comparados com dados de pacientes com NIC III e CCU invasivo da população italiana, na qual a frequência da variante L83V é maior nas lesões precursoras quando comparada aos casos de carcinoma invasivo. Estas diferenças sugerem que a oncogenicidade de variantes de E6 de HPV-16 pode ser dependente da população analisada. No entanto, deve-se levar em conta algumas limitações destes estudos, como o pequeno número de amostras analisadas.

Questões acerca da diferença de oncogenicidade das variantes, foram ainda levantadas em outros estudos, mas resultados controversos foram obtidos: NINDL *et al.*, 1999 analisaram a distribuição de variantes nos genes E6 e E7 entre pacientes com histologia normal e NIC I, pacientes com NIC II e III e pacientes com CCU. Não foram encontradas diferenças significativas, tanto na distribuição de variantes e protótipo, quanto no polimorfismo da posição 350 do gene E6.

A observação deste diferente comportamento das variantes de HPV-16 levantou questões acerca de possíveis diferenças nas propriedades bioquímicas e biológicas destas variantes. Uma vez identificada a capacidade imortalizante de E6 de HPV-16, assim como de inativação de p53 através de sua ubiquitinação, as variações na proteína E6 de HPV-16 foram investigadas. Proteínas E6 de 3 variantes distintas, com variações de aminoácidos predominantemente N-terminais, demonstraram diferente capacidade de impedir a diferenciação de queratinócitos e induzir a degradação de p53 (STÖPPLER *et al.*, 1996). A atividade do promotor P97, localizado na LCR, também foi investigada entre as diferentes variantes e indicaram uma maior atividade dos promotores de variantes asiático-americanas quando comparada a atividade de variantes européias (VERESS *et al.*, 1999; KAMMER *et al.*, 2000).

A interação dos efeitos das variações intratípicas dos HPV e de polimorfismos em genes do hospedeiro foi estudada por diversos grupos. Foi demonstrado que a proteína p53 portadora de arginina na posição 72 (p53 Arg) é mais suscetível à degradação induzida pela ligação da proteína E6 de HPV de alto risco que a proteína portadora de prolina (p53 Pro) na posição citada. A interação da proteína E6 de HPV de baixo risco não degrada a p53 com a variante prolina, mas degrada p53 com a variante arginina, sendo que esta degradação não é tão eficiente quanto àquela decorrente da interação com E6 de HPV de alto risco. Uma maior frequência de homozigotos portadores de p53 Arg, em relação a p53 Pro, foi encontrada entre pacientes com tumores associados ao HPV quando contrastados com amostras normais (STOREY *et al.*; 1998). Seqüencialmente esta investigação foi realizada por diferentes grupos, no entanto, não existe um consenso entre os achados até o presente: enquanto alguns trabalhos descreveram associações de

homozigotos portadores de alelos Arg com CCU (AGORASTOS *et al.*, 2000; MAKNI *et al.*, 2000; ZEHBE *et al.*, 1999), outros não encontraram esta associação (BERTORELLE *et al.*, 1999; HILDESHEIM *et al.*, 1998; KLAES *et al.*, 1999; LANHAM *et al.*, 1998; ROSENTHAL *et al.*, 1998; SONODA *et al.*, 1999).

Estudos abordando o papel da variação intratípica de HPV-16 e do polimorfismo de p53 na carcinogênese de cérvix uterina também foram realizados: VAN DUIN *et al.* (2000) encontraram uma maior proporção de variantes portadoras de 350T entre as pacientes com CCU homozigotas p53 Arg. No entanto, nenhuma variante específica (350T/G) ou genótipo específico de p53 foi associado a um maior risco de desenvolvimento de NIC III ou CCU. Um estudo recente (ZEHBE *et al.*, 2001) sugeriu que p53 Arg é um fator de risco ao CCU, mas que atua independentemente das variações de E6 de HPV-16.

O efeito das variações intratípicas dos HPV também foi investigado em relação a outros marcadores genéticos, como polimorfismos de genes cujos produtos têm papel na resposta imune.

1.3. Resposta Imune às Infecções Virais

A imunidade celular é o principal mecanismo de combate às infecções intracelulares, como as virais e os tumores.

As células apresentadoras de antígenos (APC) têm papel fundamental neste tipo de resposta imune, pois captam antígenos em sítios periféricos e migram aos órgãos linfóides secundários, onde ativam células T CD4⁺ (ZINKERNAGEL *et al.*, 1997). Esta ativação depende do reconhecimento do antígeno pelas células T, através da interação específica entre o receptor da célula T (TCR) e o complexo HLA-peptídeo da APC. Os sinais de ativação desencadeados na célula T pelo reconhecimento antigênico são transduzidos por moléculas invariáveis, CD3 e ζ , os quais formam junto com a molécula TCR, o complexo TCR. Além deste complexo, estão ainda envolvidas no processo moléculas coestimulatórias. Na ausência destes sinais coestimulatórios não ocorre a proliferação clonal das células T, as quais podem ser induzidas à anergia (BAL *et al.*, 1990).

A via de sinais coestimulatórios melhor caracterizada envolve a interação entre as moléculas B7-1 e B7-2, presentes nas APC, com CD28, expresso na superfície de linfócitos, sendo relevante na resposta imune a tumores. A ligação B7-CD28 promove a proliferação e diferenciação de células T. Na ausência desta interação a resposta ao tumor é inibida (CHAUX *et al.*, 1996).

A molécula CTLA-4 é um outro receptor para B7, que possui maior afinidade de ligação. CTLA-4 é expressa em células T recém ativadas e sua função é inibir a ativação destas células, estando envolvida no término da resposta das células T (ALLISON e KRUMMEL, 1995).

O papel imunoregulador dos linfócitos T CD4⁺ resulta de sua capacidade de secreção diferencial de citocinas, capazes de estimular ou inibir outras células que participam da resposta imune. Células como os linfócitos T CD8⁺, que possuem papel efetor na eliminação de células tumorais ou infectadas por vírus, dependem da ação de citocinas secretadas pelas células T CD4⁺ ou outros sinais provenientes da interação com as APC, para diferenciar-se em linfócitos citotóxicos.

Modificações no processo de apresentação e reconhecimento antigênico podem levar a ativação parcial de células T CD4⁺, com produção de citocinas, porém sem proliferação celular (KERSH e ALLEN, 1996), ou mesmo anergia (SLOAN-LANCASTER *et al.*, 1993). Este fenômeno pode ser atribuído a diferenças na avidéz da ligação, resultante de diferenças na afinidade entre TCR-peptídeo-HLA (MALHERBE *et al.*, 2000), na densidade destes complexos ou ainda a variações em sinais coestimulatórios.

A ativação de células T CD4⁺ é um passo fundamental na elaboração de uma resposta eficiente contra infecções virais e processos neoplásicos (HUNG *et al.*, 1998; TOES *et al.*, 1999). A seleção de determinantes antigênicos por diferentes moléculas HLA de classe II pode resultar em diferenças na ativação de células T CD4⁺. Estas células regulam a resposta imune através da secreção de citocinas e ativação de outras células imunocompetentes. A partir de um mesmo precursor podem se originar pelo menos 2 tipos de células T CD4⁺, as células Th1 ou Th2. Em cada uma delas, a expressão coordenada de genes leva a coexpressão de diferentes conjuntos de citocinas (revisado por REINER, 2001).

As respostas Th1 desempenham papel importante na eliminação de infecções intracelulares, pois a secreção de IFN- γ estimula a fagocitose e promove, assim como a IL-2, a diferenciação de linfócitos T CD8⁺. Estas citocinas,

juntamente com o TNF- β estão envolvidas no processo inflamatório. A resposta Th2 possui efeito anti-inflamatório, uma vez que a secreção de IL-4 e IL-13 inibem o IFN- γ , e está relacionada principalmente a processos alérgicos e resposta contra helmintos (ABBAS *et al.*, 1996, revisado por O'GARRA, 1998).

1.3.1. Papel das Moléculas HLA

Os genes que codificam as moléculas HLA, as quais apresentam os peptídeos às células T, estão localizados numa região denominada Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC). Esta região apresenta muitos genes polialélicos e altamente polimórficos. O conjunto desses alelos e suas frequências diferem entre as populações, gerando uma grande variabilidade alélica interpopulacional (revisado por PETZL-ERLER, 1999).

O MHC humano está localizado no braço curto do cromossomo 6, em 6p21.3 e compreende aproximadamente 3800 kb, onde estão localizados pelo menos 200 genes. O MHC humano está dividido em três regiões, denominadas de classe I, II e III. Na região de classe I, mais próxima ao telômero, estão os genes HLA-A, B, C, E, H, G e F; na região de classe II, mais próxima ao centrômero, encontram-se os genes que codificam as moléculas HLA-DP, DQ e DR, e na região de classe III estão os genes que codificam, entre outras, as proteínas do sistema complemento e o fator de necrose tumoral (TNF) (MOSS e KHANNA, 1999) (Figura 3).

Os produtos dos genes MHC de classe I e II são expressos na superfície celular e em humanos, por terem sido inicialmente descritos na superfície de

leucócitos (DAUSSET, 1958 citado por GÖTZE *et al.*, 1977), foram denominados Antígenos Leucocitários Humanos (HLA). Os produtos do HLA são fundamentais na resposta imune mediada pelos linfócitos T, pois as células T só reconhecerão os antígenos se os peptídeos antigênicos estiverem ligados às moléculas HLA.

Devido à proximidade dos genes nesta região, eles são segregados em blocos, e o conjunto de alelos existentes em um cromossomo é denominado haplótipo.

Figura 3: Mapa simplificado do MHC humano.
(Modificado de CAMPBELL e TROWSDALE, 1993)

1.3.2. Moléculas HLA de Classe I

As moléculas HLA de classe I são formadas por duas cadeias, uma cadeia α , codificada por genes HLA de classe I - como HLA-A, HLA-B e HLA-C - e uma cadeia β , codificada pelo gene da β_2 -microglobulina, localizado no cromossomo 15 e, portanto, não pertencente ao MHC (figura 4).

A estrutura das moléculas de classe I consiste em uma região de ligação do peptídeo, uma região semelhante à imunoglobulina - ambas extracelulares, uma região transmembrânica e uma região citoplasmática, intracelular. Os resíduos polimórficos das moléculas HLA estão localizados na fenda de ligação do peptídeo. Alguns destes determinam a especificidade de ligação para os peptídeos, formando estruturas denominadas *pockets*. Estes interagem com os resíduos do peptídeo ligado. Outros resíduos polimórficos da molécula HLA, assim como alguns resíduos do peptídeo, formam a estrutura reconhecida pela células T.

Estas moléculas são expressas na maioria das células nucleadas e são responsáveis pela apresentação de antígenos proteicos endógenos, como proteínas virais, às células T CD8⁺.

Figura 4: Representação esquemática de moléculas HLA de classes I e II.

As pontes dissulfeto estão indicadas (S-S). Na molécula HLA de classe I, a fenda de ligação do peptídeo é formada pelos domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$; e a região semelhante à imunoglobulina é constituída pelo domínio $\alpha 3$ da molécula HLA e pela $\beta 2$ -microglobulina. O sítio de ligação da molécula CD8 está localizado no domínio $\alpha 3$. Na molécula de classe II, a fenda de ligação do peptídeo é formada pelos domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$, e a região semelhante à imunoglobulina é formada pelos domínios $\alpha 2$ e $\beta 2$, sendo neste último o sítio de ligação da molécula CD4.

Proteínas endógenas devem ser degradadas em peptídeos menores, para que se encaixem na fenda das moléculas HLA de classe I e para que este complexo seja então reconhecido pelo linfócito T CD8⁺ específico. A degradação de proteínas endógenas, tanto celulares, quanto virais, ocorre nos proteossomos, que são complexos enzimáticos multiproteicos, proteolíticos, encontrados no citoplasma da maioria das células. Duas de suas subunidades catalíticas são codificadas por genes do MHC, denominados LMP-2 e LMP-7, importantes na produção dos peptídeos que se ligam às moléculas HLA de classe I. As proteínas endógenas são marcadas para degradação através do processo de ubiquitinação (revisado por YEWDELL e BENNINK, 2001).

Os peptídeos gerados nos proteossomos são transportados para o interior do retículo endoplasmático através de transporte ativo, mediado pelos produtos dos genes TAP-1 e TAP-2 (*Transporter associated with Antigen Processing*), que estão localizados na região de classe II do MHC humano. No interior do retículo endoplasmático, o peptídeo se liga à fenda da molécula HLA de classe I, já em sua forma dimérica, tornando esta molécula estruturalmente estável. Esta segue então para o Complexo de Golgi, e é transportada por vesículas exocíticas para a superfície celular. Uma vez expressa, esta molécula complexada ao peptídeo antigênico pode ser reconhecida por células T CD8⁺.

1.3.3. Moléculas HLA de Classe II

As moléculas HLA de classe II são constituídas por duas cadeias polipeptídicas, uma α e uma β , ambas codificadas por genes do MHC. No caso da molécula HLA-DQ, a cadeia α é codificada pelo gene HLA-DQA1 e a cadeia β é codificada pelo gene HLA-DQB1 (Figura 4). As principais moléculas de classe II são HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR. No caso da molécula HLA-DR, a cadeia α é codificada pelo gene HLA-DRA e a cadeia de β , por vários genes HLA-DRB. A organização genômica dos genes e pseudogenes HLA-DRB está representada na figura 5. Os genes DRB são DRB1, DRB3, DRB4 e DRB5 e os pseudogenes, DRB2, DRB6, DRB7, DRB8 e DRB9 (BODMER *et al.*, 1997).

A estrutura das moléculas de classe II é semelhante à de classe I. A fenda de ligação do peptídeo é formada pelos domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$, codificados pelo exon 2 dos genes que codificam das cadeias α e β , respectivamente. A região semelhante à imunoglobulina é formada pelos domínios $\alpha 2$ e $\beta 2$, sendo neste último o sítio de ligação da molécula CD4.

No exon 2 estão concentradas as diferenças nucleotídicas encontradas entre as variantes alélicas codificadas pelos *loci* do MHC. Estas variações podem alterar a especificidade de ligação do peptídeo a estas moléculas. O primeiro exon dos genes de classe II é responsável por uma seqüência líder, que não é encontrada na proteína madura.

Figura 5: Organização genômica dos genes HLA-DR e produtos codificados. Os grupos haplotípicos estão indicados entre parênteses e as especificidades sorológicas de cada um deles são indicadas à esquerda das chaves. Os genes estão indicados pelos quadros roxos, e os pseudogenes, pelos amarelos (Modificado de CAMPBELL e TROWSDALE, 1993).

A expressão destes genes é restrita a alguns tipos celulares, principalmente células apresentadoras de antígenos profissionais, como macrófagos, células dendríticas e células B. De acordo com o tipo celular, existem diferenças quantitativas e qualitativas na expressão destas moléculas, que pode ser induzida em outras células, principalmente por IFN- γ .

As moléculas HLA de classe II apresentam antígenos extracelulares às células T CD4⁺. A internalização destes antígenos é feita de formas diferentes pelas diferentes células apresentadoras de antígenos e estas proteínas recém internalizadas são mantidas em endossomos, que têm um pH ácido e que contêm enzimas proteolíticas, principalmente catepsinas. Estas enzimas clivam as proteínas em peptídeos, que se ligarão às moléculas de classe II.

As cadeias α e β das moléculas HLA de classe II são coordenadamente sintetizadas e unidas no retículo endoplasmático, com o auxílio de chaperonas, e a estrutura do dímero é estabilizada por uma cadeia invariável. As mesmas enzimas proteolíticas responsáveis pela formação do peptídeo atuam na proteólise da cadeia invariável, deixando apenas um peptídeo de 24 aminoácidos associado a molécula, o CLIP. A remoção deste oligopeptídeo é realizada em estágios e depende de outras moléculas codificadas por genes do MHC, denominadas HLA-DM e DO (VILLADANGOS e PLOEGH, 2000). Sem o CLIP, a fenda das moléculas de classe II pode ser ocupada pelos peptídeos originados de proteínas endocitadas e este complexo HLA-peptídeo é então exposto na superfície da célula apresentadora de antígeno, podendo ser reconhecido por linfócitos T CD4⁺.

1.3.4. Resposta Imune às Infecções por HPV e ao Carcinoma do Colo Uterino

Pacientes com imunodeficiência celular, seja iatrogênica ou adquirida, apresentam um aumento da incidência de verrugas genitais e da pele, além de aumento na progressão de lesões do colo uterino associadas ao HPV (PETRY *et al.*, 1994; GOEDERT *et al.*, 2000). Estas observações sugerem que a resposta imune celular é importante no controle da infecção por HPV. Desta forma os linfócitos T possuem um papel essencial na regressão da doença.

Linfócitos T específicos para fragmentos das proteínas E6 e E7 de HPV-16 e 18 já foram detectados tanto em sangue periférico (NIMAKO *et al.*, 1997), quanto em infiltrados inflamatórios de tecidos tumorais (EVANS *et al.*, 1997). Ensaio em camundongos demonstraram que imunizações com células dendríticas pulsadas com a proteína E7 desencadeiam uma resposta protetora contra células de tumores induzidos por HPV-16, através da ativação de linfócitos citotóxicos específicos (DE BRUIJN *et al.*, 1998). A indução de respostas T CD8⁺ específicas também foi mostrada resultando de estimulação *in vitro* com uma proteína de fusão E6/E7 e células dendríticas autólogas (MURAKAMI *et al.*, 1999). Células tumorais induzidas por HPV, e geneticamente modificadas, foram capazes de desenvolver respostas dependentes de células T CD4⁺ (HALLEZ *et al.*, 1999).

Alguns estudos já mapearam epítomos das proteínas do HPV E6, E7 e L1 apresentados à células T auxiliares e analisaram as respostas linfoproliferativas específicas, no entanto resultados contraditórios foram verificados. KADISH *et al.* (1997) demonstraram que respostas à E6 e E7 parecem estar associadas à eliminação da infecção e regressão de lesões e LUXTON *et al.* (1996) observaram que ocorre a redução de respostas à E7 e L1 em pacientes com CCU. Já DE

GRUIJL *et al.* (1996) evidenciaram que respostas à E7 são mais proeminentes em pacientes com infecção persistente que em pacientes com eliminação viral.

Experimentos em camundongos demonstraram que linhagens com distintos haplótipos H-2 (correspondente ao HLA de humanos) diferem em sua resposta linfoproliferativa a epítomos de E7 (SHEPHERD *et al.*, 1992). A intensificação da apresentação de antígenos virais (E7) pela via de classe II aumenta as respostas tanto celulares, proliferativas e citotóxicas, quanto humorais, em camundongos (WU *et al.*, 1995).

Em pacientes com lesões de alto grau e carcinoma invasivo do colo uterino observa-se uma menor secreção de IL-2, em resposta a antígenos do HPV, quando comparada a portadoras de lesões de baixo grau (TSUKUI *et al.*, 1996). Já a produção de IL-4 e IL-10 é mais elevada em pacientes com lesões que se estendem além do colo uterino, quando comparada às pacientes com lesões locais (CLERICI *et al.*, 1997). Também foi encontrada uma razão IL-12/ IL-10 menor em pacientes com lesões neoplásicas cervicais (JACOBS *et al.* 1998).

No caso da resposta humoral, foi observado que a ausência de anticorpos contra E6 e E7 em pacientes com CCU independe das variações de sequência das variantes (NINDL *et al.*, 2000), mas não existem estudos investigando o papel de possíveis alterações na resposta imune em decorrência das mutações encontradas entre as variantes de HPV em respostas celulares.

1.4. Associação entre HLA e Carcinoma do Colo Uterino

Evidências clínicas e experimentais indicam que fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro desempenham um importante papel na evolução da infecção por HPV e doenças associadas ao vírus. Estudos recentes demonstraram a presença de risco familiar para o carcinoma do colo uterino, sugerindo um componente hereditário para esta doença (HEMMINKI *et al.*, 1999).

Devido ao papel crucial das moléculas HLA na apresentação de antígenos e ao seu polimorfismo, assim como o polimorfismo do HPV, estas podem influenciar o desenvolvimento da resposta imune. Muitos estudos foram realizados investigando uma possível associação entre alelos e/ou haplótipos de HLA e infecção pelo HPV ou desenvolvimento de carcinoma de colo uterino. Associações positivas foram descritas principalmente com HLA-DQB1*03, DQB1*0602, DRB1*1501 e o haplótipo DRB1*1501-DQB1*0602, enquanto efeitos protetores foram atribuídos em diferentes estudos aos alelos DRB1*1301 e DRB1*1302, e aos haplótipos em que estes alelos estão inseridos (WANK e THOMSEN, 1991, APPLE *et al.*, 1994, SANJEEVI *et al.*, 1996, SASTRE-GARAU *et al.*, 1996). Recentemente nosso grupo demonstrou uma associação positiva entre DRB1*15 com casos de carcinoma do colo uterino portadores de HPV. No mesmo estudo foi encontrada uma menor frequência de portadores de DR13 entre os casos com o carcinoma do colo uterino quando comparados aos controles (MACIAG *et al.*, 2000).

Com relação à variação de E6 e E7 de HPV e HLA, não foi demonstrada correlação entre incidência de variantes de HPV-16, polimorfismo de HLA e progressão da doença ou persistência viral (BONTKES *et al.*, 1998). No entanto, há

poucos estudos investigando uma possível relação entre as mutações em proteínas encontradas nas variantes e os alelos e haplótipos HLA.

Muitas das substituições de aminoácidos encontradas em E6 de variantes de HPV-16 estão posicionadas em regiões antigênicas da molécula. Em uma grande proporção de pacientes HLA-B7 positivos, foi identificada uma variante de HPV-16 que apresenta uma mutação de ponto na proteína E6. Esta modificação, que altera a ligação do epítipo à molécula HLA-B7, poderia influenciar o reconhecimento apropriado pelo linfócito específico (ELLIS *et al.* 1995).

A verificação das possíveis alterações causadas na resposta imune, devido às diferenças nas proteínas antigênicas de diferentes variantes de HPV-16, além do conhecimento de fatores genéticos que participam do controle desta resposta, é de fundamental importância permitir avanços no projeto de vacinas contra o HPV e aplicação de imunoterapias em pacientes com carcinoma do colo uterino. Desta forma, nos propomos a investigar se a distribuição dos alelos HLA entre casos de carcinoma do colo uterino difere de acordo com a variante de HPV-16 e, ainda, identificar se as associações descritas entre carcinoma do colo uterino e alelos HLA podem ser atribuídas a diferentes variantes de HPV-16.

2. OBJETIVOS

Pequenas variações de aminoácidos em proteínas antigênicas podem levar a diferenças na ligação destes peptídeos às moléculas HLA. Tais mudanças podem resultar em diferenças na eficácia de apresentação e reconhecimento antigênicos, podendo desta forma influenciar a resposta imune. Para verificar se as alterações entre variantes de HPV-16 podem estar influenciando a resposta imune, este trabalho tem como objetivos específicos:

- Identificar as variantes de HPV-16 encontradas em casos de carcinoma do colo uterino provenientes de amostras da cidade de João Pessoa.
- Verificar se existem diferenças na distribuição de alelos HLA entre pacientes com carcinoma do colo uterino portadoras de diferentes variantes de HPV-16 e controles.
- Identificar se as diferentes associações anteriormente descritas entre carcinoma do colo uterino e alelos HLA podem ser atribuídas a diferentes variantes de HPV-16.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras

As amostras analisadas neste estudo são pertencentes a um estudo epidemiológico sobre câncer do colo uterino e infecção por HPV numa população do nordeste brasileiro, conduzido no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, em São Paulo (ILPC-SP) (FRANCO *et al.*, 1995b). As amostras utilizadas como controles foram coletadas de mulheres com esfregaços cervicais normais ou sem sinais de displasia em exames ginecológicos de rotina, no Hospital Napoleão Laureano, na cidade de João Pessoa, Paraíba. Os casos incluíram mulheres com CCU admitidas para cirurgia no mesmo hospital ou mulheres com CCU invasivo confirmado histopatologicamente, entre 1986 e 1990. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética local e todas as pacientes consentiram por escrito a realização de procedimentos do estudo, incluindo a coleta de esfregaços cervicais ou biópsias de tecidos tumorais. O DNA destas amostras foi extraído e armazenado no ILPC-SP.

Em 1995, amostras deste estudo epidemiológico (FRANCO *et al.*, 1995b) foram selecionadas para um estudo de associação entre os genes HLA e a presença do HPV e câncer de colo uterino (MACIAG *et al.*, 2000). A escolha destas amostras foi baseada na disponibilidade de DNA para o estudo citado. Foram utilizadas 418 amostras, sendo 161 casos de CCU positivos para o DNA de HPV e 257 controles.

Para o presente estudo foram selecionadas as amostras de pacientes HPV-16 positivas, portadoras de câncer de colo uterino, com seus haplótipos HLA tipados no estudo anterior (MACIAG *et al.*, 2000), compreendendo um total de 112

amostras. Para as comparações de frequências dos grupos HLA, foram utilizadas no grupo controle 257 mulheres sem alterações citológicas do colo uterino, sendo 36 destas amostras portadoras do DNA de HPV.

3.2. Detecção e tipagem de HPV

(etapa realizada por outros pesquisadores/técnicos deste grupo de pesquisa)

A detecção e tipagem dos HPV desta amostra foram realizadas pelo grupo de Virologia do ILPC-SP, através da amplificação de um fragmento de 450pb do gene viral L1, com os primers MY09 e MY11 (TING e MANOS, 1990). Como controle interno da reação de PCR, amplificou-se adicionalmente o gene da β -globina, originando um produto de 268pb (SAIKI *et al.*, 1988). Os produtos obtidos nas reações de amplificação foram imobilizados em membranas de náilon e submetidos a posterior hibridação com uma sonda genérica, marcada com isótopo radioativo, para a detecção do DNA viral de vários tipos de HPV. As amostras positivas foram então hibridadas com sondas específicas para mais de 30 tipos de HPV, permitindo a discriminação entre eles (BAUER *et al.*, 1991).

3.3. Tipagem de HLA

(etapa realizada por outros pesquisadores/técnicos deste grupo de pesquisa)

A tipagem dos genes HLA-DQB1 e DRB1 foi realizada através da técnica PCR-SSO, que consiste na amplificação por PCR do segundo exon polimórfico de cada um destes genes, seguida da hibridação com oligonucleotídeos-sonda de sequência específica. O padrão resultante da hibridação de cada amostra com as diversas sondas permite a identificação dos alelos.

Os primers e sondas utilizados foram os recomendados pelo 12º Workshop Internacional de Histocompatibilidade (12º IHWC) (BIGNON e FERNANDEZ-VIÑA, 1994).

Para a tipagem do gene HLA-DQB1 são usadas 36 sondas na discriminação de 22 alelos, e para o gene HLA-DRB1, 100 sondas que permitem a discriminação de 104 alelos.

3.4. Tipagem das Variantes de HPV-16

O método utilizado para a tipagem das variantes moleculares de HPV-16 consiste na amplificação de fragmentos dos genes virais L1 e E6, seguido da imobilização destes produtos em membrana de náilon. Estas membranas são então utilizadas em reações de hibridação com oligonucleotídeos-sonda de sequência específica. Este método foi desenvolvido por WHEELER *et al.* (1997) e a análise do padrão de hibridação da amostra de cada indivíduo com cada uma das

sondas permite a identificação da variante como pertencente a cada um dos ramos: europeu (E), asiático (As), asiático-americano (AA), e africanos (Af-1 e Af-2). Também é capaz de distinguir as subclasses G131, subclasse da classe E, e norte-americana-1 (NA-1), subclasse da classe AA (YAMADA *et al.*, 1995).

3.4.1. Reação de amplificação do gene E6

As condições empregadas nas reações de PCR dos genes E6 e L1 estão descritas em WHEELER *et al.* (1997). Foram utilizados tubos para PCR de 0,2ml e termociclador TC-341 (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England).

No caso de E6, trata-se de uma reação de PCR do tipo *nested* realizada em um tubo. As condições utilizadas foram KCl 50mM, Tris-HCl 10mM pH=8,3, 200 μ M de cada dNTP, MgCl₂ 2,5mM, 2,5U de *Taq* DNA polimerase (Gibco BRL Life Technologies, Rockville, USA). A concentração dos primers da reação externa é limitante, 0,001 μ M cada iniciador (CW1 e CW2, tabela 1), e sua temperatura de anelamento é de 57°C. A temperatura de anelamento dos primers internos é 45°C, e sua concentração no tubo de reação é de 0,2 μ M (CWS, CWA, tabela 1).

A ciclagem consistiu de 30 ciclos iniciais com 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de anelamento a 57°C e 60 segundos de extensão a 72°C. Em seguida são realizados mais 35 ciclos semelhantes, exceto pela temperatura de anelamento, que passou a ser 45°C.

Uma alíquota de 5 μ l do produto da reação foi analisada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio a 0,5%. O fragmento resultante da PCR do gene precoce E6 com estes primers é de 584pb.

Em todas as reações foram incluídos controles positivos e negativos. O controle positivo usado foi DNA de plasmídeo contendo o genoma completo de HPV-16; e como controle negativo foi incluído na reação de PCR um tubo com a mistura da reação, porém sem DNA.

3.4.2. Reação de amplificação do gene L1

A reação de amplificação do gene L1 consiste em uma PCR *nested* realizada em dois tubos, sendo o produto da primeira reação usado como molde para a segunda. A primeira reação é realizada com KCl 50mM, Tris-HCl 10mM pH=8,3, 200 μ M de cada dNTP, MgCl₂ 4mM, 2,5U de *Taq* DNA polimerase (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, USA) e 0,5 μ M de cada iniciador (MY9 e MY11, tabela 1). A ciclagem desta reação consiste na desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos com 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de anelamento a 55°C e 60 segundos de extensão a 72°C. A reação é finalizada com um ciclo a 72°C por 5min. O molde da segunda reação é uma alíquota de 2 μ l do produto desta primeira PCR. O volume final da segunda reação é de 100 μ l, e as condições são as seguintes: KCl 50mM, Tris-HCl 10mM pH=8,3, 200 μ M de cada dNTP, MgCl₂ 2,5mM, 2,5U de *Taq* DNA polimerase (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, USA) e 0,2 μ M de cada primer (CWS1L, CWS2L, e CWAL, tabela 1). Esta reação é realizada em 25 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de anelamento a 52°C e 60 segundos de alongamento a 72°C. O último ciclo foi estendido por 6 minutos a 72°C. O produto resultante da amplificação do gene L1 tem 423 pb.

Para verificação da qualidade da reação 5µl do produto da reação foi analisado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio a 0,5%. Em todas as reações foram incluídos controles positivos e negativos. O controle positivo usado foi DNA de plasmídeo contendo o genoma completo de HPV-16; e como controle negativo foi incluído na reação de PCR um tubo com a mistura da reação, porém sem DNA.

3.4.3. Preparo das Membranas

Meio microlitro de cada produto de PCR foi aplicado em membranas Hybond N, com o auxílio do robô Flexys (Genomic Solutions, Ann Arbor, USA). Além das amostras a serem tipadas, controles são incluídos nas membranas: DNA de diferentes variantes de HPV-16 previamente tipados por seqüenciamento. Em seguida as membranas são desnaturadas em NaOH 0,4M por 3 minutos e hidratadas em SSPE 3x por 2 minutos. A fixação das amostras nas membranas é feita no UV Crosslinker (Fisher Biotech, Pittsburgh, USA).

Tabela 1: Iniciadores utilizados para amplificação de fragmentos dos genes E6 e L1.

NT¹	Gene Alvo	Iniciador	Seqüência do Iniciador²
31 - 51	E6 ³ - reação externa	CW1	CGTAACCGAAATCGGTTGAAC
659 - 683		CW2	GGACCATCTATTTTCATCCTCCT
56 - 72	E6- reação interna	CWS	ACCGGTTAGTATAAAAG
624 - 640		CWA	GCTCATAACAGTAGAG
7035 - 7055	L1 ⁴ - reação externa	MY9	CGTCCMARRGGAWACTGATC
6584 - 6604		MY11	GCMCAGGGGCWCATAAAYAATGG
6598 - 6619	L1- reação interna	CWS1L	AATGGCATTGTGTTGGGGTA
6599 - 6618		CWS2L	TAATGGCATTGTGTTGGGGT
6999 - 7021		CWAL	CTGATCTAGGTCTGCAGAAAAC

¹NT: posições nucleotídicas relativas à HPV-16 conforme MYERS *et al.* (1995);

²as seqüências estão escritas no sentido 5'-3'. M=A+C, R=A+G, W=A+T, Y=C+T;

³YAMADA *et al.*, 1995;

⁴MANOS *et al.*, 1989.

3.4.4. Hibridação

O processo de hibridação é realizado em garrafas de hibridação de 200ml e forno Hybaid (Middlesex, UK). Inicialmente as membranas são bloqueadas em 10ml de SSPE 0,1x - SDS 0,5%, durante 20 minutos, à 42°C. A solução então é retirada e coloca-se 10 ml da solução de hibridação (SSPE 5X - SDS 0,1% e 2 pmoles da sonda biotinilada) por 3 a 12h.

Após a hibridação, são feitas 3 lavagens de 10 minutos. A primeira é de baixo rigor, feita a temperatura ambiente e as duas seguintes são de alto rigor, a temperatura de 44 ou 47°C, de acordo com a sonda utilizada. Nestas lavagens são utilizados 10ml de SSPE 2x - SDS 0,1%.

As membranas são então incubadas com o conjugado *Horseradish peroxidase-Streptavidin* (Vector Laboratories, Burlingame, USA), durante 20 minutos à temperatura ambiente: prepara-se uma solução com 6µl de conjugado (solução estoque de 1mg/ml) para 90ml de SSPE 2x - SDS 0,1%, e utiliza-se 10 ml desta solução para cada membrana. Em seguida são feitas 3 lavagens com 10 ml de SSPE 2x - SDS 0,1%, a temperatura ambiente, para retirada de excesso de conjugado. A primeira por 5 minutos, e as 2 seguintes por 10 minutos.

Então as membranas são retiradas das garrafas de hibridação e colocadas todas juntas, em SSPE 2x - SDS 0,1%.

Na revelação através de quimioluminescência, utiliza-se o Kit ECL – Direct nucleic acid labelling and detection system (Amersham Life Science, Buckinghamshire, England): são colocados 0,5ml de solução A + 0,5ml de solução B sobre a membrana, e então ela é exposta em filme de raio X Kodak X-Omat K

XK-1 (Rochester, USA) por exposição de 5 minutos. Faz-se ainda uma segunda exposição, variando de 30 a 60 minutos.

A remoção das sondas é feita pelo aquecimento das membranas a 70°C, durante 15 minutos, em água miliQ. Após a desibridação as membranas podem ser reutilizadas.

Para discriminação das variantes do gene E6 são utilizadas 23 sondas para identificação de 13 posições nucleotídicas variáveis (posições 109, 131, 132, 143, 145, 178, 183, 286, 289, 335, 350, 403, e 532). Para o gene L1, são utilizadas 12 sondas específicas, conforme descrito na tabela 2, que têm como alvo 6 posições nucleotídicas variáveis (6695, 6721, 6803, 6854, 6862, 6694) (YAMADA *et al.*, 1995).

As seqüências das sondas, assim como as temperaturas de lavagem estão descritas em WHEELER *et al.* (1997); exceto as sondas de E6 350 G e 403 A, em que a temperatura de lavagem foi 47°C.

Tabela 2: Sondas complementares aos genes L1 e E6 para tipagem das variantes moleculares de HPV-16.

NT ¹	Seqüência da sonda	NT ¹	Seqüência da sonda	NT ¹	Seqüência da sonda
6695 A ²	CTTCAGAA <u>A</u> CTACATAT	109T	CAATGTT <u>I</u> CAGGACC	183G ²	ATGATATAA <u>G</u> ATTAGAATGT
6695 C ²	CTTCAGGAA <u>C</u> CTACATAT	109C	CAATGTT <u>C</u> CAGGACC	286/9TA	CATATGC <u>I</u> GT <u>A</u> TGTGAT
6721 A	AACTTTAA <u>A</u> GAGTACCTA	131/2AG ²	CGACCC <u>A</u> GAAAGTTAC	286/9AG	ATATGC <u>A</u> GT <u>G</u> TGTGATA
6721 G	CTAACTTTAAG <u>G</u> GAGTAC	131/2GG ²	ACCC <u>G</u> GAAAGTTACC	335C ²	GTATAGA <u>C</u> ATTATTGTTAT
6803 A ²	CGTTATG <u>A</u> CATACATAC	131/2AC ²	GACCC <u>A</u> CAAAGTTAC	335T ²	GTATAGA <u>T</u> ATTATTGTTATA
6803 T ²	CGTTATG <u>I</u> CATACATAC	131/2AT ²	GACCC <u>A</u> TAAAGTTACC	350T ²	TTGTTATAGT <u>I</u> TGTATGGAA
6854/6862 CT	TGGT <u>C</u> TACAAC <u>C</u> ICC	143/5CG ²	GTTACCA <u>C</u> AGTTATGC	350G ²	TTGTTATAGT <u>G</u> TGTATGGAA
6854/6862 CC	TGGT <u>C</u> TACAAC <u>C</u> CCC	143/5GT ²	GTTACCA <u>G</u> ATTATGCA	403A	TGTGATTGTT <u>A</u> AATTAGGT
6854/6862 TT	TTGCT <u>T</u> TACAAC <u>C</u> ICC	143/5CT ²	TTACCA <u>C</u> ATTATGCAC	403G	GTGATTGTT <u>G</u> AATTAGGT
6854/6862 TC	TTGGT <u>T</u> TACAAC <u>C</u> CCC	178T ²	CTATACATGA <u>T</u> ATAATATTAG	532A	AGATCATC <u>A</u> AGAACACG
6994 G	TAAA <u>G</u> GAAAAGTTTTCTG	178G ²	TATACATGA <u>G</u> ATAATATTAG	532G	GATCATC <u>G</u> AGAACAC
6994 A	TTAAA <u>A</u> GAAAAGTTTTCTG	183T ²	CATGATATAA <u>T</u> ATTAGAATG		

Extraído de YAMADA *et al.*, 1995;

¹NT: posições nucleotídicas relativas à HPV-16 conforme MYERS *et al.* (1995);

²posições cujas alterações nucleotídicas resultam em mudança de aminoácido.

3.4.5. Análise Estatística

A magnitude das associações entre as variantes de HPV-16 e os grupos sorológicos de HLA foi estimada através da *Odds Ratio* e seu respectivo intervalo de 95% de confiança, usando o software SPSS 10.0 (SPSS, Chicago, Il). São realizadas análises utilizando tabelas de contingência, do tipo 2 x 2 (SVEJGAARD e RYDER, 1994), conforme indicado a seguir.

	Portadores do grupo HLA analisado	Não portadores do grupo HLA analisado	
Pacientes com CCU portadores da variante analisada	a	b	a+b
Controles	c	d	c+d
	a+c	b+d	a+b+c+d

Para cada comparação foi estimada uma razão de chance (OR), obtida através da fórmula de WOOLF (1955):

$$OR = a.d / b.c$$

Nos casos em que algum dos valores (a, b, c, d) corresponde a zero, a OR resultante teria valores extremos (zero ou infinito), e esta estimativa é imprecisa e, portanto, nestes casos não é calculada.

Os valores da OR na análise realizada estimam a probabilidade de uma paciente com CCU, portadora de um determinado grupo HLA ser portadora da variante em questão. O cálculo da OR, diferentemente do valor de *p*, indica se a

tendência da associação é positiva ou negativa: se o valor for 1, indica que a probabilidade desta paciente ser portadora da variante é a mesma de não ser portadora. Valores acima de 1, indicam uma maior probabilidade de ser portadora da variante, e menores, uma chance menor.

Para testar a significância estatística do desvio da OR em relação à unidade, utilizou-se o teste exato de Fischer bilateral (ZAR, 1974). Os intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para os valores de OR foram calculados conforme a expressão (WOOLF, 1955):

$$IC(95\%) = e^{\left[\ln(OR) - 1,96 \cdot \sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}} \right]} a^{\left[\ln(OR) + 1,96 \cdot \sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}} \right]}$$

A exclusão da unidade no intervalo de confiança de 95% corresponde a um valor de p inferior a 0,05. No entanto, o cálculo do IC permite estimar a precisão da medida, pois intervalos de menor amplitude são mais precisos que intervalos mais amplos.

4. RESULTADOS

4.1. Variantes de HPV-16

Do total de 112 amostras, uma delas foi excluída da análise por não conter mais DNA e outras 3 foram excluídas por não terem sido amplificadas pelas PCR utilizadas. Este resultado negativo pode ser atribuído a má qualidade do DNA, devido ao armazenamento prolongado da amostra, ou ainda a algum erro de tipagem prévio.

A análise do padrão de hibridação da amostra de cada indivíduo com o conjunto de sondas permite a identificação da variante como pertencente a cada um dos ramos filogenéticos: europeu (E), asiático-americano (AA), e africanos (Af-1 e Af-2) (HO *et al.*, 1993). Também é capaz de distinguir as subclasses G131 e asiática (As)¹, subclasses da classe E; e NA-1, subclasse da classe AA (YAMADA *et al.*, 1995). A figura 6 apresenta autoradiogramas de membranas submetidas à hibridação com as sondas 350T e 350G, complementares ao gene E6. Os padrões das variantes encontradas nos genes E6 e L1 estão descritos nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

¹ Apesar de HO *et al.*, 1993 terem descrito o grupo de variantes asiáticas como pertencentes a um ramo, em YAMADA *et al.*, 1995 este grupo é descrito como uma subclasse.

Figura 6: Autoradiogramas de membranas submetidas à hibridação com os oligonucleotídeos-sonda 350T e 350G, complementares ao gene E6 de HPV-16. As amostras foram aplicadas em duplicatas laterais e na mesma posição nas duas membranas. Nas posições A1, A2 e A3 estão os controles positivos da sonda 350T e nas posições A4 e A5 estão os controles positivos para a sonda 350G. Amostras como as das posições B1, C5 e D5 não foram definidas e, portanto, não estão incluídas nas análises aqui apresentadas.

Tabela 3: Alterações de nucleotídeos e aminoácidos encontradas em E6 nas variantes moleculares de HPV-16.

NT	AA	P	P350G	Nova ¹	G131	G131-350T ²	AA	NA-1	AF-1	AF-2
109	2	T(Phe)	.	.	.	.	.	.	.	C
131	10	A(Arg)	.	.	G (Gly)	G (Gly)	.	.	.	.
132	10	G(Arg)	.	.	G	G	.	.	C (Thr)	T (Ile)
143	14	C(Gln)	.	.	.	.	.	.	G	G
145	14	G(Gln)	.	.	.	.	T (His)	T (His)	T (Asp)	T (Asp)
178	25	T(Asp)	.	ND	.	.	.	.	.	.
183	27	T(Ile)	.	ND	.	.	.	.	.	.
286	61	T(Ala)	.	.	.	.	A	A	A	A
289	62	A(Val)	.	.	.	.	G	G	G	G
335	78	C(His)	.	.	.	.	T (Tyr)	T (Tyr)	T (Tyr)	T (Tyr)
350	83	T(Leu)	G (Val)	.	G (Val)	.	G (Val)	G (Val)	.	.
403	100	A(Leu)	.	.	.	.	.	.	.	G
532	103	A(Ser)	.	.	.	.	G	.	.	.

¹Nova: Esta variante é idêntica ao protótipo exceto pelas posições nucleotídicas 178 e 183, podendo ser uma variante nova, relacionada ao protótipo.

²Esta variante é idêntica a G131 descrita, exceto pela posição 350;

Os pontos indicam nucleotídeos iguais aos do protótipo. Os casos em que há alteração de aminoácido estão entre parênteses.

NT: Posição nucleotídica;

AA: Posição do aminoácido;

P: Protótipo;

ND: Não determinado.

Tabela 4: Variações nas seqüências do gene e da proteína L1 nas variantes moleculares de HPV-16.

NT	AA	P	P6994A	G131 ¹	AA	NA-1	AF-1	AF-2
6695	353	A (Thr)	.	.	C (Pro)	C (Pro)	.	C (Pro)
6721	361	G (Lys)	.	.	A	A	A	A
6803	389	A (Thr)	.	.	T (Ser)	.	.	.
6854	406	C (Leu)	.	.	T	T	T	T
6862	408	T (Pro)	.	C	.	.	.	.
6994	452	G (Lys)	A	.	A	A	A	A

Apenas as posições em que foram encontradas alterações nucleotídicas estão mostradas. Os pontos indicam nucleotídeos iguais ao do protótipo. Os casos em que há alteração de aminoácido estão entre parênteses.

¹A variante G131 descrita e a G131-350T apresentam o mesmo padrão no gene L1.

NT: Posição nucleotídica;

AA: Posição do aminoácido;

P: Protótipo.

Os resultados obtidos, em 89 amostras que apresentaram uma única variante de HPV-16, são mostrados na tabela 5. No caso do gene L1, foram tipadas 90 amostras, mas apenas 89 amostras para o gene E6, devido a falha na amplificação de uma amostra do gene E6. Desta forma, não foi possível a tipagem de 3 amostras para o gene L1 e 4 para o gene E6. Adotamos como critério para identificação da variante que a tipagem dos genes E6 e L1 fossem compatíveis, portanto, a amostra com a tipagem apenas de L1 não foi incluída em nossa análise. Estão incluídas, no entanto, uma amostra que apresentou o padrão de protótipo, exceto por apresentar a mutação 6994A (P6994A) e uma variante européia da subclasse G131, que difere da variante G131 descrita inicialmente (YAMADA *et al.*, 1995) por apresentar a mutação 350T sendo, por este motivo, denominada neste estudo como G131-350T. As mutações citadas acima já foram encontradas em outros estudos. Uma amostra apresentou um padrão incompatível com as variantes descritas anteriormente, e está sendo denominada neste estudo como Nova.

Tabela 5: Distribuição das variantes moleculares de HPV-16 encontradas nas amostras de CCU.

	Nº de Portadores	Frequência (%)	Variantes	Nº de Portadores	Frequência (%)
Européias	40	44,94	P ¹	33	37,08
			P350G	4	4,49
			P6994A	1	1,12
			G131-350T	1	1,12
			Nova	1	1,12
Não- européias	49	55,06	AF-1	1	1,12
			AF-2	6	6,74
			AA	41	46,07
			NA-1 (AA)	1	1,12
TOTAL²	89	100		89	100

¹Segundo referência OR.5110 (YAMADA *et al.*, 1995);

²Excluem as amostras com infecções múltiplas.

Uma das amostras classificadas como protótipo apresentou sinal de fundo nas hibridações com as sondas de L1, correspondente à variante AA. No entanto, como os resultados das sondas de E6 não confirmaram tal padrão, esta foi tipada apenas como protótipo, baseando-se no padrão definido no gene E6.

Em 18 amostras o padrão identificado corresponde à infecção por mais de uma variante de HPV-16. Pretende-se analisar posteriormente estas amostras, através da clonagem e seqüenciamento de diferentes clones da mesma amostra, o que permite a identificação das diferentes variantes em infecções múltiplas. No entanto, para as análises aqui apresentadas, foram utilizados apenas os resultados de infecção por uma única variante, uma vez que no caso de infecção por múltiplas variantes não se pode atribuir a uma variante o desencadeamento do processo neoplásico ou estimar a sua contribuição à doença.

Para uma das análises, as variantes foram agrupadas de acordo com sua origem geográfica em duas categorias: variantes européias e não-européias. O grupo não-europeu inclui as variantes asiático-americanas (AA), sua subclasse NA-1, e as africanas (Af-1 e Af-2). O grupo europeu inclui as variantes protótipo, protótipo com a mutação 350G (P350G), P6994A, G131-350T e a amostra classificada como Nova (tabela 5). Este tipo de agrupamento foi utilizado em outros estudos e permite a comparação de nossos dados com aqueles publicados por outros grupos.

4.2. Análise de HLA em CCU e Controles

4.2.1. Análise de Ramos de Variantes de HPV-16

Os dados aqui apresentados resultam da comparação da distribuição de grupos HLA entre pacientes com CCU, portadoras de variantes de HPV-16 pertencentes a cada ramo, e controles. Este grupo controle é constituído de 257 mulheres, com seus genótipos e haplótipos HLA conhecidos, e inclui amostras sem lesões neoplásicas tanto positivas (n=36) quanto negativas para HPV (n=195), além de 26 amostras inadequadas para tipagem de HPV (MACIAG *et al.*, 2000). A comparação entre CCU HPV-16 positivos portadores de cada variante com amostras do grupo controle portadoras da mesma variante não foi possível, devido ao pequeno número de mulheres portadoras de DNA de HPV-16 no grupo controle: apenas 7 em 257 mulheres.

Apesar da metodologia utilizada na tipagem de HLA ser de alta resolução, a qual permite a identificação de alelos, para as comparações entre casos e controles as amostras foram agrupadas segundo sua especificidade sorológica. Este agrupamento permite uma análise mais consistente dos dados, uma vez que alguns alelos são encontrados em baixa frequência nesta população e a comparação de suas frequências resultaria numa análise imprecisa. Os grupos sorológicos de HLA-DRB1 e DQB1 e respectivos alelos pertencentes a cada grupo estão listados nas tabelas 6 e 7, respectivamente.

Muitos estudos investigam a associação entre haplótipos HLA-DRB1-DQB1 e CCU. Em nosso estudo, devido ao número limitado de amostras e conseqüentemente, pequeno número de portadores de alguns haplótipos, optamos

por analisar apenas os genes HLA-DRB1 e DQB1 separadamente. Os haplótipos encontrados nesta amostra, o número de portadores e a frequência de cada um deles são apresentados na tabela 8.

A comparação entre os números de portadores de alelos de um grupo e o número de portadores do haplótipo que contem este alelo podem não ser iguais. No caso de uma paciente portadora de HLA-DRB1*0101/*0102, ela aparecerá 2 vezes na tabela 6, uma vez que os alelos estão discriminados nesta tabela, mas nas tabelas seguintes será contada uma única vez como portadora de DR1. Outras diferenças podem ocorrer nas amostras em que só foi possível a tipagem genérica, mas não a discriminação alélica: em um controle foi possível a tipagem como portador de DR13, mas não de qual dos alelos (*1301, *1302, *1303). Este controle aparece nas tabelas como portador de DR13, mas não na tabela 6, em que só aparecem os portadores de cada um dos alelos.

Outra possibilidade é que o número de portadores de um determinado grupo na tabela de portadores de haplótipos seja diferente do número de portadores deste grupo nas tabelas seguintes. Isto pode acontecer porque homozigotos para o grupo DQ7, por exemplo, podem apresentar alelos de diferentes grupos de DRB1, como DR11 e DR8.

Tabela 6: Grupos sorológicos de HLA-DRB1 e alelos em casos e controles.

Grupos Sorológicos	Alelos	Controles	Casos
		(n=257) P (FP)	(n=89) P (FP)
DR1	*0101	25 (9,7)	6 (6,7)
	*0102	29 (11,3)	11 (4,3)
	*0103	2 (0,8)	0
DR3	*03011	40 (15,6)	13 (14,6)
	*0302	9 (3,5)	6 (6,7)
DR4	*0401	13 (5,0)	2 (2,2)
	*0402	10 (3,9)	2 (2,2)
	*0403	7 (2,7)	1 (1,1)
	*0404	12 (4,7)	4 (4,5)
	*0405	10 (3,9)	2 (2,2)
	*0406	3 (1,2)	0
	*0407	5 (1,9)	1 (1,1)
	*0408	2 (0,8)	2 (2,2)
	*0411	15 (5,8)	2 (2,2)
DR7	*0701	57 (22,2)	23 (25,8)
DR8	*0801	9 (3,5)	4 (4,5)
	*0802	9 (3,5)	2 (2,2)
	*0803	3 (1,2)	1 (1,1)
	*08041	13 (5,0)	5 (5,6)
DR9	*09012	8 (3,1)	6 (6,7)
DR10	*1001	11 (4,3)	1 (1,1)
DR11	*1101	36 (14,0)	15 (16,8)
	*1102	7 (2,7)	2 (2,2)
	*1103	2 (0,8)	1 (1,1)
	*1104	8 (3,1)	0
DR12	*1201	8 (3,1)	2 (2,2)
DR13	*1301	29 (11,3)	9 (10,1)
	*1302	27 (10,5)	4 (4,5)
	*1303	4 (1,6)	2 (2,2)
DR14	*1401	12 (4,7)	2 (2,2)
	*1402	7 (2,7)	2 (2,2)
DR15	*1501	19 (7,4)	10 (11,2)
	*1502	1 (0,4)	2 (2,2)
	*1503	14 (5,4)	12 (13,5)
DR16	*1601	7 (2,7)	3 (3,4)
	*1602	19 (7,4)	2 (2,2)

P (FP): número de portadores (frequência de portadores, em %)

Tabela 7: Grupos sorológicos de HLA-DQB1 e alelos em casos e controles.

Grupos Sorológicos	Alelos	Controles	Casos
		(n=257)	(n=89)
		P (FP)	P (FP)
DQ2	*02012	93 (36,2)	34 (38,2)
DQ3 - DQ7	*0301	78 (30,3)	29 (32,6)
DQ8	*0302	56 (21,8)	10 (11,2)
DQ9	*03032	16 (6,2)	6 (6,7)
DQ4	*0402	40 (15,6)	14 (15,7)
DQ1 - DQ5	*0501	71 (27,6)	22 (24,7)
	*0502	14 (5,4)	2 (2,2)
DQ6	*0601	0	2 (2,2)
	*0602	44 (17,1)	22 (24,7)
	*0603	28 (10,9)	10 (11,2)
	*0604	19 (7,4)	4 (4,5)

P (FP): número de portadores (frequência de portadores, em %)

Tabela 8: Número de portadores e frequência dos haplótipos HLA-DRB1-DQB1 em casos de CCU positivos para variantes de HPV-16 e controles.

Haplótipos	Controles (n=257)	Casos (n=89)	E (n=40)	N-E (n=49)	AA (n=41)	AF (n=7)	350T (n=43)	350G (n=46)
	P (FP)	P (FP)	P (FP)	P (FP)	P (FP)	P (FP)	P (FP)	P (FP)
01-05	52 (20,2)	19 (21,3)	11 (27,5)	8 (16,3)	8 (19,5)	0	9 (20,9)	10 (21,7)
03-02	40 (15,6)	13 (14,6)	5 (12,5)	8 (16,3)	7 (17,1)	1 (14,3)	6 (14,0)	7 (15,2)
03-04	9 (3,5)	6 (6,7)	2 (5,0)	4 (8,2)	4 (9,8)	0	2 (4,7)	4 (8,7)
04-07	14 (5,4)	4 (4,5)	3 (7,5)	1 (2,0)	1 (6,7)	0	2 (4,7)	2 (4,3)
04-08	55 (21,4)	10 (11,2)	3 (7,5)	7 (14,3)	7 (17,1)	0	2 (4,7)	8 (17,4)
07-02	47 (18,3)	20 (22,5)	8 (20,0)	12 (24,5)	7 (17,1)	4 (57,1)	11 (25,6)	9 (19,6)
07-09	9 (3,5)	3 (3,4)	1 (2,5)	2 (4,1)	2 (4,9)	0	1 (2,3)	2 (4,3)
08-04	26 (10,1)	7 (7,9)	3 (7,5)	4 (8,2)	4 (9,8)	0	3 (7,0)	4 (8,7)
08-07	7 (2,7)	5 (5,6)	3 (7,5)	2 (4,1)	1 (2,4)	1 (14,3)	4 (9,3)	1 (2,2)
09-09	5 (1,9)	3 (3,4)	1 (2,5)	2 (4,1)	2 (4,9)	0	1 (2,3)	2 (4,3)
09-02	3 (1,2)	3 (3,4)	1 (2,5)	2 (4,1)	1 (2,4)	1 (14,3)	2 (4,7)	1 (2,2)
10-05	11 (4,3)	1 (1,1)	1 (2,5)	0	0	0	1 (2,3)	0
11-07	39 (15,2)	15 (16,9)	6 (15)	9 (18,4)	6 (14,6)	2 (28,6)	7 (16,3)	8 (17,4)
11-06	12 (4,7)	3 (3,4)	0	3 (6,1)	2 (4,9)	1 (14,3)	1 (2,3)	2 (4,3)
12-05	8 (3,1)	0	0	0	0	0	0	0
13-06	50 (19,5)	13 (14,6)	5 (12,5)	8 (16,3)	6 (14,6)	2 (28,6)	7 (16,3)	5 (10,9)
14-05	12 (4,7)	2 (2,2)	2 (5,0)	0	0	0	2 (4,7)	0
14-07	7 (2,7)	1 (1,1)	1 (2,5)	0	0	0	1 (2,3)	0
15-06	33 (12,8)	20 (22,5)	12 (30,0)	11 (22,4)	10 (24,4)	1 (14,3)	12 (27,9)	11 (23,9)
16-05	6 (2,3)	2 (2,2)	1 (2,5)	1 (2,0)	1 (2,4)	0	1 (2,3)	1 (2,2)
16-07	13 (5,1)	1 (1,1)	1 (2,5)	0	0	0	1 (2,3)	0

P (FP): número de portadores (frequência de portadores, em %)

A frequência dos grupos HLA-DRB1 e DQB1 entre casos portadores de variantes européias, asiático-americanas e africanas foi comparada com a frequência nos controles. Foram também realizadas análises reunindo todas as portadoras de variantes não-européias. A tabela 9 apresenta os resultados da comparação de variantes européias com os controles. Na tabela 10 estão listados os resultados da análise de variantes não-européias.

Tabela 9: OR e IC 95% para CCU portadores de variantes europeias de acordo com grupos HLA.

HLA	CCU – Variantes Europeias					
	Casos (n=40)		Controles (n=257)		OR	IC 95%
	P/N	FP (%)	P/N	FP (%)		
DRB1						
DR1	12/28	30	52/205	20,2	1,69	0,80-3,55
DR3	8/32	20	49/208	19,1	1,06	0,46-2,45
DR4	6/34	15	74/183	28,8	0,44	0,18-1,08
DR7	9/31	22,5	57/200	22,2	1,02	0,46-2,26
DR8	6/34	15	34/223	13,2	1,16	0,45-2,96
DR9	2/38	5	8/249	3,1	1,64	0,33-8,01
DR10	1/39	2,5	11/246	4,3	0,57	0,07-4,57
DR11	6/34	15	53/204	20,6	0,68	0,27-1,70
DR12	1/39	2,5	8/249	3,1	0,80	0,10-6,56
DR13	5/35	12,5	61/196	23,7	0,46	0,17-1,22
DR14	3/37	7,5	19/238	7,4	1,02	0,29-3,60
DR15	13/27	32,5	34/223	13,2	3,16	1,49-6,71*
DR16	4/36	10	26/231	10,1	0,99	0,32-2,99
DQB1						
DQ2	13/27	32,5	93/164	36,2	0,85	0,42-1,72
DQ3	19/21	47,5	138/119	53,7	0,78	0,40-1,52
*0301 (DQ7)	15/25	37,5	78/179	30,4	1,38	0,69-2,75
0302 (DQ8)	3/37	7,5	56/201	21,8	0,29	0,09-0,98
*0303 (DQ9)	2/38	5	16/241	6,2	0,79	0,17-3,59
DQ4	6/34	15	40/217	15,6	0,96	0,38-2,43
DQ5	17/23	42,5	95/162	37	1,26	0,64-2,48
DQ6	16/24	40	87/170	33,9	1,30	0,66-2,58

*Valores estatisticamente significativos;

P/N: número de portadores/ número de não portadores;

FP: frequência de portadores, em %.

Tabela 10: OR e IC 95% para CCU portadores de variantes não-européias de acordo com grupos HLA.

HLA	CCU – Variantes não-européias					
	Casos (n=49)		Controles (n=257)		OR	IC 95%
	P/N	FP (%)	P/N	FP (%)		
DRB1						
DR1	8/41	16,3	52/205	20,2	0,77	0,34-1,74
DR3	12/37	24,5	49/208	19,1	1,38	0,67-2,83
DR4	9/40	18,4	74/183	28,8	0,56	0,26-1,20
DR7	14/35	28,6	57/200	22,2	1,40	0,71-2,79
DR8	6/43	12,2	34/223	13,2	0,91	0,36-2,31
DR9	4/45	8,2	8/249	3,1	2,77	0,80-9,57
DR10	0/49		11/246	4,3	NC	
DR11	12/37	24,5	53/204	20,6	1,25	0,61-2,56
DR12	1/48	2	8/249	3,1	0,65	0,08-5,30
DR13	11/38	22,4	61/196	23,7	0,93	0,45-1,93
DR14	1/48	2	19/238	7,4	0,26	0,34-2,00
DR15	11/38	22,4	34/223	13,2	1,90	0,89-4,07
DR16	1/48	2	26/231	10,1	0,18	0,02-1,40
DQB1						
DQ2	21/28	42,9	93/164	36,2	1,32	0,71-2,46
DQ3	22/27	44,9	138/119	53,7	0,70	0,38-1,30
*0301 (DQ7)	14/35	28,6	78/179	30,4	0,92	0,47-1,80
*0302 (DQ8)	7/42	14,3	56/201	21,8	0,60	0,26-1,40
*0303 (DQ9)	4/45	8,2	16/241	6,2	1,34	0,43-4,19
DQ4	8/41	16,3	40/217	15,6	1,06	0,46-2,43
DQ5	9/40	18,4	95/162	37,0	0,38	0,18-0,83*
DQ6	20/29	40,8	87/170	33,9	1,35	0,72-2,52

*Valores estatisticamente significativos;

P/N: número de portadores/ número de não portadores;

FP: frequência de portadores, em %.

Observamos, nesta amostra, tendências protetoras dos grupos DR4 e DR13 para tumores portadores de qualquer HPV (DR4: OR, 0,87; IC 95% 0,53-1,43 e DR13: OR, 0,72; IC 95% 0,41-1,26 em MACIAG *et al.*, 2000). Tendências semelhantes foram encontradas quando comparou-se apenas casos portadores de variantes de HPV-16 européias (OR, 0,44; IC 95% 0,18-1,08 e OR, 0,46; IC 95% 0,17-1,22, para DR4 e DR13 respectivamente), sendo o efeito nesta última comparação mais pronunciado, quando comparado ao efeito atribuído às variantes não-européias (DR4: OR, 0,56; IC 95% 0,26-1,20 e DR13: OR, 0,93; IC 95% 0,45-1,93).

Uma maior proporção de portadores de DR15 foi encontrada entre casos com CCU portadores de HPV-16 quando comparados aos controles (OR, 2,30; IC 95% 1,27-4,18 em MACIAG *et al.*, 2000). Associações semelhantes também foram encontradas quando os casos foram estratificados de acordo com as variantes. No entanto, os casos portadores de variantes de HPV-16 européias apresentam OR mais alta (tabela 9: OR, 3,16; IC 95% 1,49-6,71) que casos portadores de variantes asiático-americanas (tabela 11: OR, 2,05; IC 95% 0,92-4,55) e africanas (tabela 12: OR, 1,09; IC 95% 0,1-9,4).

O grupo DQ5 mostrou um efeito protetor entre CCU portadores de variantes não-européias (OR, 0,38; IC 95% 0,18-0,83), que não foi visto entre as européias (OR, 1,26; IC 95% 0,64-2,48). Um efeito protetor deste alelo foi anteriormente descrito nesta amostra, tanto para CCU portadores de qualquer HPV (OR, 0,57; IC 95% 0,35-0,92), quanto para casos portadores de HPV-16 (OR, 0,66; IC 95% 0,39-1,12) (MACIAG *et al.*, 2000). Este último pode ser atribuído principalmente às variantes asiático-americanas (OR, 0,47; IC 95% 0,21-1,01), cujos resultados são mostrados na tabela 11, uma vez que estas constituem a maior parte do grupo não-

européu analisado (42/49). Entre as pacientes com CCU portadoras de variantes africanas (Af-1 e/ou Af-2) não foram encontradas portadoras de DQ5, o que impossibilita o cálculo de uma estimativa de risco.

O grupo DQ3 apresentou tendências interessantes: apesar do efeito do grupo não parecer diferencial entre casos portadores de qualquer HPV e controles (OR, 1,06, IC 95% 0,68-1,65 em MACIAG *et al.*, 2000), tendências protetoras são encontradas tanto entre CCU portadores de variantes européias quanto de não-européias. A análise dos dois principais alelos de DQ3 encontrados nesta amostra revelou tendências diferentes: enquanto DQ7 (DQB1*0301) apresenta OR de 1,38 e 0,92 para européias e não-européias, respectivamente, DQ8 apresenta OR de 0,29 e 0,60 para os mesmos grupos de variantes, respectivamente (tabelas 9 e 10).

Tabela 11: OR e IC 95% para CCU positivos para variantes de HPV-16 asiático-americanas de acordo com grupos HLA.

HLA	CCU – Variantes asiático-americanas					
	Casos (n=42)		Controles (n=257)		OR	IC 95%
	P/N	FP (%)	P/N	FP (%)		
DRB1						
DR1	8/34	19,0	52/205	20,2	0,93	0,41-2,12
DR3	11/31	26,2	49/208	19,1	1,51	0,71-3,21
DR4	9/33	21,4	74/183	28,8	0,67	0,31-1,48
DR7	10/32	23,8	57/200	22,2	1,10	0,51-2,37
DR8	5/37	11,9	34/223	13,2	0,89	0,33-2,41
DR9	3/39	7,1	8/249	3,1	2,39	0,61-9,41
DR10	0/42		11/246	4,3	NC	
DR11	9/33	21,4	53/204	20,6	1,05	0,47-2,33
DR12	1/41	2,4	8/249	3,1	0,76	0,09-6,23
DR13	9/33	21,4	61/196	23,7	0,88	0,40-1,93
DR14	1/41	2,4	19/238	7,4	0,31	0,04-2,35
DR15	10/32	23,8	34/223	13,2	2,05	0,92-4,55
DR16	1/41	2,4	26/231	10,1	0,22	0,03-1,64
DQB1						
DQ2	16/26	38,1	93/164	36,2	1,09	0,55-2,13
DQ3	19/23	45,2	138/119	53,7	0,71	0,37-1,37
*0301 (DQ7)	11/31	26,2	78/179	30,4	0,81	0,39-1,70
*0302 (DQ8)	7/35	16,7	56/201	21,8	0,72	0,30-1,70
*0303 (DQ9)	4/38	9,5	16/241	6,2	1,59	0,51-5,00
DQ4	8/34	19,0	40/217	15,6	1,28	0,55-2,96
DQ5	9/33	21,4	95/162	37	0,47	0,21-1,01
DQ6	16/26	38,1	87/170	33,9	1,20	0,61-2,36

P/N: número de portadores/ número de não portadores;
FP: frequência de portadores, em %.

A comparação entre casos portadores de variantes de HPV-16 de cada ramo filogenético e controles permitiu ainda a observação de efeitos não observados quando todos os casos portadores de HPV-16 foram analisados juntos e comparados com os controles. Apesar do pequeno número de variantes africanas encontradas (apenas 7, sendo umas delas do ramo africano-1 e 6, africano-2), a comparação entre estes casos com os controles revelou associações positivas com DR7 e DQ2 (tabela 12).

Tabela 12: OR e IC 95% para CCU positivos para variantes de HPV-16 africanas de acordo com grupos HLA.

HLA	CCU – Variantes Africanas (AF-1 e AF-2)							CCU – Variantes Africanas-2						
	Casos (n=7)			Controles (n=257)				Casos (n=6)			Controles (n=257)			
	P/N	FP (%)		P/N	FP (%)	OR	IC 95%	E/N	FP (%)		P/N	FP (%)	OR	IC 95%
DRB1														
DR3	1/6	14,3		49/208	19,1	0,71	0,08-6,01	1/5	16,7		49/208	19,1	0,85	0,10-7,43
DR7	4/3	57,1		57/200	22,2	4,68	1,02-21,51*	4/2	66,7		57/200	22,2	7,02	1,25-39,30*
DR8	1/6	14,3		34/223	13,2	1,09	0,13-9,36	1/5	16,7		34/223	13,2	1,31	0,15-11,57
DR9	1/6	14,3		8/249	3,1	5,19	0,56-48,29	1/5	16,7		8/249	3,1	6,22	0,65-59,62
DR11	3/4	42,9		53/204	20,6	2,89	0,63-13,29	2/4	33,3		53/204	20,6	1,92	0,34-10,79
DR13	2/5	28,6		61/196	23,7	1,28	0,24-6,79	1/5	16,7		61/196	23,7	0,64	0,07-5,61
DR15	1/6	14,3		34/223	13,2	1,09	0,13-9,36	1/5	16,7		34/223	13,2	1,31	0,15-11,57
DQB1														
DQ2	5/2	71,4		93/164	36,2	4,41	0,84-23,17	5/1	83,3		93/164	36,2	8,82	1,02-76,61*
DQ3	3/4	42,9		138/119	53,7	0,65	0,14-2,95	2/4	33,3		138/119	53,7	0,43	0,08-2,40
*0301 (DQ7)	3/4	42,9		78/179	30,4	1,72	0,38-7,87	2/4	33,3		78/179	30,4	1,15	0,21-6,40
*0302 (DQ8)						NC							NC	
*0303 (DQ9)						NC							NC	
DQ6	4/3	57,1		87/170	33,9	2,60	0,57-11,90	3/3	50		87/170	33,9	1,95	0,39-9,88

*Valores estatisticamente significativos;
P/N: número de portadores/ número de não portadores
FP: frequência de portadores em %.

4.2.2. Análise da posição nucleotídica 350 do gene E6 de HPV-16

Estudos prévios mostraram a presença do nucleotídeo G na posição 350 do gene E6, que codifica para o aminoácido valina na posição 83 da proteína, associado à persistência viral (LONDESBOROUGH *et al.*, 1996). Esta posição também foi analisada no presente estudo e os resultados são apresentados na tabela 13. DR4 apresentou um efeito protetor (OR, 0,25; IC, 0,09-0,73), assim como DQ8 (OR, 0,18; IC, 0,04-0,75), entre os casos portadores de variantes 350T, que codifica o aminoácido leucina. Foi encontrada uma associação positiva com DR15 (OR, 2,84; IC, 1,35-5,98), que mostrou-se mais acentuada no caso do alelo DRB1*1503 (OR, 3,38; IC, 1,28-8,92) com os casos portadores destas variantes.

Não foram encontrados resultados estatisticamente significativos quando comparou-se a distribuição de HLA entre casos portadores de variantes 350G (valina) e controles. No entanto, também foi encontrada uma tendência positiva com DR15 (OR, 2,06; IC, 0,96-4,44) e uma tendência protetora com DQ5 (OR, 0,54; IC, 0,26-1,10).

Tabela 13: ORs e IC 95% para CCU positivos para variantes de 350T (leu) e 350G (val) de E6 de acordo com grupos HLA.

HLA	CCU – Variantes 350T (leucina)						CCU – Variantes 350G (valina)					
	Casos (n=43)			Controles (n=257)			Casos (n=46)			Controles (n=257)		
	P/N	FP (%)	OR	P/N	FP (%)	IC 95%	P/N	FP (%)	OR	P/N	FP (%)	IC 95%
DRB1												
DR1	10/33	23,3	1,20	52/205	20,2	0,55-2,58	10/36	21,7	1,09	52/205	20,2	0,51-2,35
DR3	9/34	20,9	1,12	49/208	19,1	0,51-2,50	11/35	23,9	1,33	49/208	19,1	0,63-2,81
DR4	4/39	9,3	0,25	74/183	28,8	0,09-0,73*	11/35	23,9	0,78	74/183	28,8	0,37-1,61
DR7	12/31	27,9	1,36	57/200	22,2	0,66-2,81	11/35	23,9	1,10	57/200	22,2	0,53-2,31
DR8	7/36	16,3	1,27	34/223	13,2	0,53-3,09	5/41	10,9	0,80	34/223	13,2	0,29-2,17
DR9	3/40	7	2,33	8/249	3,1	0,59-9,17	3/43	6,5	2,17	8/249	3,1	0,55-8,51
DR10	1/42	2,3	0,53	11/246	4,3	0,67-4,23	0/46		NC	11/246	4,3	NC
DR11	8/35	18,6	0,88	53/204	20,6	0,38-2,01	10/36	21,7	1,07	53/204	20,6	0,50-2,29
DR12	1/42	2,3	0,74	8/249	3,1	0,09-6,08	1/45	2,2	0,69	8/249	3,1	0,08-5,66
DR13	7/36	16,3	0,62	61/196	23,7	0,26-1,47	9/37	19,6	0,78	61/196	23,7	0,36-1,71
DR14	3/40	7	0,94	19/238	7,4	0,27-3,32	1/45	2,2	0,28	19/238	7,4	0,04-2,13
DR15	13/30	30,2	2,84	34/223	13,2	1,35-5,98*	11/35	23,9	2,06	34/223	13,2	0,96-4,44
DR16	4/39	9,3	0,91	26/231	10,1	0,30-2,75	1/45	2,2	0,20	26/231	10,1	0,03-1,49
DQB1												
DQ2	17/26	39,5	1,15	93/164	36,2	0,59-2,24	17/29	37	1,03	93/164	36,2	0,54-1,98
DQ3	18/25	41,9	0,62	138/119	53,7	0,32-1,19	23/23	50	0,86	138/119	53,7	0,46-1,62
*0301 (DQ7)	15/28	34,9	1,23	78/179	30,4	0,62-2,43	14/32	30,4	1,00	78/179	30,4	0,51-1,99
0302 (DQ8)	2/41	4,7	0,17	56/201	21,8	0,04-0,75	8/38	17,4	0,76	56/201	21,8	0,33-1,71
*0303 (DQ9)	2/41	4,7	0,74	16/241	6,2	0,16-3,31	4/42	8,7	1,43	16/241	6,2	0,46-4,50
DQ4	6/37	14	0,88	40/217	15,6	0,35-2,22	8/38	17,4	1,14	40/217	15,6	0,50-2,63
DQ5	15/28	34,9	0,91	95/162	37,0	0,46-1,80	11/35	23,9	0,54	95/162	37,0	0,26-1,10
DQ6	19/24	44,2	1,55	87/170	33,9	0,80-2,98	17/29	37	1,14	87/170	33,9	0,60-2,20

*Valores estatisticamente significativos;
P/N: número de portadores/ número de não portadores
FP: frequência de portadores em %.

5. DISCUSSÃO

Com o objetivo de avaliar uma possível interação entre o polimorfismo de genes HLA de classe II e variantes de HPV-16 no risco de carcinoma do colo uterino, foram analisadas neste estudo amostras de pacientes com CCU portadoras deste HPV da cidade de João Pessoa. Estas amostras foram previamente tipadas para a presença do DNA de HPV, e de 161 amostras de mulheres com CCU em que foi detectado o DNA do HPV, foram analisadas neste estudo as 112 amostras portadoras do DNA de HPV-16. A metodologia utilizada na caracterização das variantes de HPV-16 destas amostras foi a amplificação de fragmentos dos genes E6 e L1, seguida da hibridação dos produtos de PCR de cada amostra com diversos oligonucleotídeos-sonda de seqüência específica. Apesar de estudos de variabilidade analisarem principalmente a LCR, preferimos analisar os genes E6 e L1 porque nosso objetivo está relacionado à identificação de comportamentos diferenciáveis de variantes de acordo com o polimorfismo das moléculas HLA. Uma vez que a função biológica das moléculas HLA é a apresentação de antígenos proteicos às células T, apenas as alterações em regiões codificadoras, potencialmente antigênicas, foram avaliadas. A análise de E6 também permite identificar subclasses que não são identificadas por marcadores nucleotídicos da seqüência da LCR (WHEELER *et al.*, 1997).

Das 89 amostras em que detectou-se o padrão de infecção por uma única variante de HPV-16, 40 apresentaram variantes do ramo europeu, e entre as outras 49 pacientes em que foram identificadas variantes não-européias, 42 delas apresentaram variantes asiático-americanas e 7 amostras são portadoras de variantes africanas. A presença destas diferentes variantes entre os casos de CCU

permitiu a comparação da distribuição dos grupos HLA entre os grupos portadores de variantes de diferentes ramos e controles, diferentemente dos estudos europeus. Estes restringem suas análises às variantes européias, uma vez que são encontradas pouquíssimas variantes de outros ramos. Por isso, em sua maioria, estes estudos utilizam as categorias protótipo e variantes não-protótipo em suas comparações.

A classificação de variantes apenas como protótipo e não-protótipo, apesar de útil para a comparação dos dados com outros estudos, inclui num mesmo grupo inúmeras variantes não relacionadas, pois estão no grupo não-protótipo tanto variantes européias, que diferem do protótipo em apenas 2 posições nucleotídicas do gene E6, quanto variantes do ramo africano-2, que diferem em 8 posições nucleotídicas neste gene (YAMADA *et al.*, 1995). Em nosso estudo foi realizada uma análise agrupando todas as variantes de ramos não-europeus. A análise agrupando variantes não-européias aumenta o poder estatístico nas comparações. Ainda assim, comparamos a distribuição de alelos HLA entre pacientes com CCU portadoras de variantes de HPV-16 pertencentes aos ramos europeu, asiático-americano e africanos 1 e 2 com os controles separadamente.

Foram encontradas variantes européias em 44,9% dos casos e não-européias em 55,6% dos casos. Esta distribuição se assemelha a distribuição encontrada em outro estudo realizado com casos da cidade de Belém (JUNES, 2000), o qual encontrou 46,6% das amostras de CCU portadoras de variantes européias e 53,3% de não-européias. ZEHBE *et al.* (1998) sugeriram que variantes não-protótipo estariam associadas à progressão de doença, uma vez que encontrou na população sueca uma distribuição equilibrada nos casos de CIN III: 56% de variantes não-protótipo e 44% de protótipo, enquanto nos casos de CCU a

freqüência de variantes não-protótipo foi de 94%. Nossos dados não parecem corroborar estes achados, uma vez que a prevalência de variantes não-protótipo em nossos casos de CCU é de 62,9%. No entanto, não investigamos a prevalência de variantes em lesões precursoras ou amostras normais. VAN DUIN *et al.* (2000) e BONTKES *et al.* (1998) também não encontraram associações entre variantes e risco de desenvolvimento de NIC III ou CCU na população holandesa. Na Alemanha, NINDL *et al.* (1999), que analisaram E6 e E7, não encontraram diferenças estatisticamente significativas na prevalência de protótipo ou variantes não-protótipo em NIC II/III ou CCU invasivo. No estudo brasileiro de JUNES (2000) uma maior proporção de variantes não-protótipo foi encontrada tanto nos casos de CCU, como entre os casos de NIC III. No entanto, para avaliar se variantes conferem diferentes riscos de progressão de doença seriam necessários estudos avaliando a distribuição de variantes em amostras normais, de lesões precursoras e de carcinoma de colo uterino invasivo. Recentemente, um estudo avaliando diferentes populações demonstrou que a prevalência de variantes difere em lesões de diferentes graus de acordo com a população estudada: enquanto na população sueca a variante protótipo é mais encontrada em lesões de baixo grau, sua distribuição não se altera em diferentes graus de lesão na população italiana e é maior nas lesões de alto grau e carcinoma invasor na população tcheca (dado não significativo estatisticamente) (ZEHBE *et al.*, 2001). No entanto, neste estudo a maioria das variantes encontradas eram pertencentes ao ramo europeu. Evidências de um risco diferencial ao CCU foram descritas num estudo caso-controle recentemente realizado na população mexicana (BERUMEN *et al.*, 2001). Estes autores concluíram que o risco associado a pacientes com CCU portadoras de

variantes asiático-americanas é maior que o risco entre portadoras de variantes européias.

Estudos de associação comparam amostras de indivíduos não consangüíneos entre si, afetados pela doença, com indivíduos não afetados da população em geral. Para evitar associações espúrias, o grupo controle deve ser o mais semelhante possível ao grupo de casos, tanto em relação a sua composição étnica, quanto o período e local de obtenção de amostras. Para verificar se a distribuição de alelos HLA entre pacientes com CCU portadoras de cada variante de HPV-16 difere da distribuição da população livre de doença, um grupo controle foi utilizado para comparação com os casos de carcinoma de colo uterino. Este grupo é composto de 257 amostras de DNA provenientes de esfregaços cervicais, coletados na mesma área e período dos casos.

Quando foi contrastada a freqüência de cada alelo e/ou grupo HLA no grupo de pacientes com CCU portadoras de variantes européias com o grupo controle, foi encontrada uma maior freqüência do grupo HLA-DRB1*15 entre os casos (tabela 9: OR, 3,16; IC, 1,49-6,71). Esta associação positiva pode ser atribuída principalmente ao alelo HLA-DRB1*1503 (OR, 3,06; IC, 1,10-8,51), uma vez que a estratificação desta análise por alelos de HLA-DRB1*15 não revelou associação semelhante, entre os outros alelos encontrados nesta amostra, apenas uma tendência positiva no caso do alelo HLA-DRB1*1501 (OR, 2,21; IC, 0,82-5,92). Apesar da análise dos casos portadores de variantes não-européias ter revelado uma tendência semelhante, não foi encontrada associação estatisticamente significativa. A estratificação do grupo portador de variantes não-européias em cada um dos ramos filogenéticos das variantes de HPV-16 identificou associação positiva marginalmente significativa entre as portadoras de variantes asiático-

americanas (tabela 11: OR, 2,05; IC, 0,92-4,55), ainda que mais fraca que a descrita com as portadoras de variantes européias. Entre as amostras portadoras de variantes de HPV-16 africanas, a frequência de HLA-DRB1*15 não difere dos controles (tabela 12: OR, 1,09; IC, 0,13-9,36).

Aos portadores de alelos HLA-DRB1*15 foram atribuídos maiores riscos tanto de desenvolvimento de carcinoma escamoso do colo uterino quanto suas lesões precursoras, em estudos de diferentes populações. Entre elas, a associação foi descrita entre mulheres suecas (SANJEEVI *et al.*, 1996) e mestiças (de origem caucasóide e ameríndia) do Novo México (EUA) - particularmente o alelo HLA-DRB1*1501 (APPLE *et al.*, 1994 e 1995). Estas associações mostraram ser mais acentuadas quando analisados apenas os casos HPV-16 positivos, e nossos dados indicam que a estratificação por variantes de HPV-16 aumenta ainda mais o risco, no caso de variantes européias. No entanto, num estudo realizado por HILDESHEIM *et al.* (1998) foi atribuído um efeito protetor ao haplótipo DRB1*1501-DQB1*0602 em casos de lesões de colo de útero alto grau e controles da população americana. Como o risco de DR15 foi diferente de acordo com as variantes em nosso estudo, seria interessante avaliar a distribuição de variantes nestas populações e verificar se estas contribuem para esta diferença de riscos atribuídos ao DR15. Deve-se ainda ressaltar que a associação descrita em nosso estudo pode ser atribuída principalmente ao alelo DRB1*1503. A ausência de estudos de outras populações descrevendo associações com este alelo se deve a sua baixa frequência nas populações analisadas, majoritariamente caucasóides. Este alelo é mais comum em populações negróides, enquanto o alelo *1501 é mais comum a população caucasóide (MORAES *et al.*, 1993).

A maioria dos estudos de diferentes populações descreveram associações positivas de DR15 com CCU, indicando que este alelo confere suscetibilidade ao CCU. Como os alelos do grupo DR15 estão em desequilíbrio de ligação com alelo DQB1*0602, outra possibilidade seria que o efeito fosse atribuído ao alelo de DQB1 ou, ainda, resultaria de efeito aditivo dos 2 *loci*. No entanto, a contribuição de DQB1*0602 parece ser menor, uma vez que na maioria dos estudos o risco atribuído a DR15 é maior que o risco atribuído a DQ6 (revisado por MACIAG e VILLA, 1999).

Um estudo de WANK *et al.* (1993), realizado com amostras da população da Tanzânia, predominantemente negróide, mostrou uma associação positiva entre o alelo DQB1*0602 e CCU. No nosso estudo não foram encontradas associações de DQ6 com CCU portadores de diferentes variantes de HPV-16. Esta ausência é explicada porque o alelo DQB1*0602 além de ser encontrado no haplótipo com DRB1*1503, também foi encontrado em haplótipos com DRB1*1501 e DRB1*1101. No caso do haplótipo DRB1*1501-DQB1*0602, sua frequência não difere entre casos e controles, enquanto o haplótipo DRB1*1101-DQB1*0602 foi mais encontrado entre controles que casos.

Estudos prévios apresentaram associação positiva de haplótipos portadores de DR4 com CCU tanto portadores de HPV-16 quanto de outros tipos de HPV. Os estudos da população hispânica (APPLE *et al.*, 1994 e 1995) atribuíram um maior risco para o desenvolvimento tanto de CCU quanto de NIC aos haplótipos DRB1*0407-DQB1*0302. Também foi encontrado um maior risco de NIC na população britânica associado aos haplótipos portadores de alelos deste grupo, tais como DRB1*0401-DQB1*0301, DRB1*0401-DQB1*0302, DRB1*0403-DQB1*0302 (ODUNSI *et al.*, 1996). Em nosso estudo, a análise de ramos de variantes não

revelou associações estatisticamente significativas, mas tendências protetoras foram vistas tanto para casos portadores de variantes européias (tabela 9: OR, 0,44; IC, 0,18-1,08), quanto não-européias (tabela 10: OR, 0,56; IC, 0,26-1,20). Este último efeito pode ser atribuído, em parte, às variantes asiático-americanas (tabela 11: OR, 0,67; IC, 0,31-1,48). A contribuição de variantes africanas não foi estimada, pois não encontramos estas variantes entre as portadoras de DR4.

Os alelos de DR4 encontrados, assim como de DR11, estão em desequilíbrio de ligação com DQ3 (MACIAG *et al.*, 2000). O efeito do grupo DQ3 na suscetibilidade ao CCU é controverso. Vários estudos investigaram a distribuição destes alelos em casos de CCU e controles em diferentes populações. Após a descrição de uma associação positiva por WANK e THOMSEN, em 1991, na população alemã, outros estudos corroboraram este achado em diferentes populações. Foram encontradas associações positivas tanto do grupo DQ3, quanto de seus alelos individualmente ou haplótipos portadores destes (DAVID *et al.*, 1992; HELAND *et al.*, 1992; VANDELVELDE *et al.*, 1993; MEHAL *et al.*, 1994; NAWA *et al.*, 1995; GREGOIRE *et al.*, 1994; ODUNSI *et al.*, 1996). No entanto, outros estudos não encontraram associação deste grupo (WANK *et al.*, 1993), principalmente na população britânica (GLEW *et al.*, 1992 e 1993).

Os 3 alelos DQB1*0301, DQB1*0302 e DQB1*0303 que codificam para os 3 antígenos de DQ3 (DQ7, DQ8 e DQ9, respectivamente) compartilham epítomos comuns. No estudo de WANK e THOMSEN (1991) foi descrita uma associação com este grupo. Estudos posteriores investigaram os subtipos de DQ3, e foram descritas associações positivas com DQB1*0301 e DQB1*0303 (WANK *et al.*, 1992), ou apenas com o alelo DQB1*0303, como na população belga (VANDENVELDE *et al.*, 1993). Interessantemente, em todas as comparações do

nosso estudo, a OR do grupo DQ3 foi inferior a unidade, sugerindo associações negativas, ainda que não tenham atingido significância estatística. Um resultado marginalmente significativo foi encontrado na comparação de portadores de DQB1*0302 (tabela 9: OR, 0,29; IC, 0,09-0,98) e CCU portadores de variantes de HPV-16 européias, enquanto com variantes não-européias foram vistas apenas tendências (tabela 10 - NE: OR 0,60; IC, 0,26-1,40; tabela 11 - AA: OR 0,72; IC, 0,30-1,70; AF: não calculadas por não terem sido encontradas portadoras destas variantes e deste alelo). Interessantemente, a OR conferida ao alelo DQB1*0301 entre portadoras de variantes européias (tabela 9: OR, 1,38; IC, 0,69-2,75) demonstrou tendência oposta. Mesmo entre as variantes não-européias, os valores são mais próximos da unidade (tabela 10 - NE: OR 0,92; IC, 0,47-1,80; tabela 11 - AA: OR 0,81; IC, 0,39-1,70; tabela 12 - AF: OR, 1,72; IC, 0,38-7,87). Estes resultados sugerem que os alelos de DQ3 podem apresentar efeitos diferentes na suscetibilidade ao CCU. Resultados interessantes foram obtidos na comparação de pacientes portadoras de variantes 350T e 350G com controles. Em ambos os casos, não foram encontradas diferenças no efeito do grupo DQ3: ambos apresentaram OR inferior à unidade, mas desvios não significativos. No entanto, a análise dos alelos deste grupo separadamente, mostra um efeito protetor ao CCU em portadores do alelo DQB1*0302 e de variantes de HPV-16 350T. O mesmo efeito não é visto com o alelo mais freqüente deste grupo, o DQB1*0301. As comparações dos grupos controle e casos portadores de variantes 350G também indicam uma tendência protetora ao alelo DQB1*0302, mas estes resultados não foram estatisticamente significativos.

Algumas substituições de aminoácidos em porções antigênicas das proteínas podem ter implicações estruturais e funcionais que determinam

diferenças na resposta imune entre as moléculas HLA-DQ. A substituição de um aminoácido de um peptídeo derivado de HSV impediu sua ligação a molécula DQ3.2, codificada pelo alelo DQB1*0302, mas este mesmo peptídeo passa a ser capaz de se ligar às moléculas DQ3.1 e 3.3, codificadas pelos alelos DQB1*0301 e DQB1*0303, respectivamente, que diferem de DQ3.2 na posição 57 do polipeptídeo: substituição de uma alanina por aspartato. Essa alteração tem um papel estrutural na formação de uma ponte salina em uma das extremidades da fenda de ligação do peptídeo da molécula HLA-DQ, que leva à modificação do reconhecimento da célula T específica: o peptídeo alterado elimina a reatividade da célula T no contexto da molécula DQ3.2, mas este mesmo clone reconhece o peptídeo no contexto da molécula DQ3.3 (KWOK *et al.*, 1996). Para a investigação das implicações decorrentes das diferenças encontradas no comportamento dos alelos DQ3 em estudos de associação com CCU são necessários estudos funcionais. Nossos dados indicam uma proteção conferida apenas pelo alelo DQB1*0302 em pacientes com CCU portadoras de variantes européias. Esta associação negativa também foi vista entre portadoras de variantes 350T. Estudos combinando o comportamento da molécula codificada por este alelo com antígenos virais oriundos de diferentes variantes de HPV poderiam contribuir para o esclarecimento do papel de DQ3 na infecção por HPV e/ou CCU.

Apesar do alelo DQB1*0303 apresentar frequência mais alta no grupo 350G que nos controles e 350T, as diferenças não foram estatisticamente significativas. Uma análise em uma amostra maior seria mais adequada para verificar o efeito deste alelo, uma vez que encontramos poucas portadoras desse alelo em nossa amostra.

Diferentemente de outros grupos que são encontrados tanto positiva quanto negativamente associados ao risco de desenvolvimento de lesões de colo do útero, ao grupo HLA-DR13 foi atribuído um efeito protetor em estudos de diferentes populações: hispânica (APPLE *et al.*, 1994 e 1995), francesa (SASTRE-GARAU *et al.*, 1996), sueca (SANJEEVI *et al.*, 1996) e americana (HILDESHEIM *et al.*, 1998). Nossos resultados estão de acordo com estes achados da literatura, uma vez que tanto entre as mulheres portadoras de variantes européias (tabela 9: OR, 0,46; IC, 0,17-1,22), quanto não-européias (tabela 10: OR, 0,93; IC, 0,45-1,93) este grupo pareceu ser menos representado que nos controles. Os resultados obtidos nas comparações com os ramos africanos, parecem contrários (tabela 12 - AF: OR, 1,28; IC, 0,24-6,79 e AF-2: OR, 0,64; IC, 0,07-5,61), mas estas variações podem ocorrer devido ao pequeno número de portadoras destas variantes no nosso estudo. Por isso, estes resultados devem ser interpretados com cautela já que as diferenças, envolvendo principalmente ramos africanos, no nosso estudo, podem ser devido ao acaso. Ao mesmo tempo, verdadeiras associações podem não estar sendo vistas e, portanto, outros estudos serão necessários para corroborar os resultados aqui apresentados.

Um alelo do grupo HLA-DRB1*01 foi encontrado num haplótipo associado a efeito protetor num estudo inglês (ODUNSI *et al.*, 1996): DRB1*0101-DQB1*0501. No entanto, em outros trabalhos já foi descrita a associação com DQ5, que está em desequilíbrio de ligação com DR1, no caso deste haplótipo. No estudo realizado anteriormente com esta amostra (MACIAG *et al.*, 2000), foi descrito um efeito protetor de HLA-DQB1*05 e CCU portadores de HPV-16. Pelo presente trabalho, com a análise estratificada de variantes, verificamos que este efeito pode ser atribuído principalmente aos casos de CCU portadores de variantes não-européias

de HPV-16 (tabela 10: OR, 0,38; IC, 0,18-0,83). Estas pacientes também apresentaram uma menor frequência de DR1 (tabela 10 - NE: OR, 0,77; IC, 0,34-1,74). Uma importante contribuição a este efeito pode ser atribuída às variantes AA (tabela 11: OR, 0,47; IC, 0,21-1,01). Não foram encontradas portadoras destes alelos entre as pacientes com CCU portadoras de variantes africanas. Já entre os casos portadores de variantes européias, tanto portadores de DR1, quanto DQ5 (tabela 9: OR, 1,69; IC, 0,80-3,55 e OR, 1,26; IC, 0,64-2,48, respectivamente) não apresentaram tendências protetoras.

A estratificação dos casos de acordo com os ramos filogenéticos das variantes de HPV-16 encontradas permitiu a identificação de associações não vistas anteriormente. A comparação entre casos portadores de variantes africanas com os controles revelou associações positivas com DR7 (tabela 12: OR, 4,68; IC, 1,02-21,51), sendo a OR ainda maior quando foram analisados apenas as portadoras de variantes do ramo AF-2 (tabela 12: OR, 7,02; IC, 1,25-39,30), apesar da pouca precisão da estimativa conforme indicado pela amplitude dos intervalos de confiança. No caso das AF-2, também foi encontrada uma associação com o grupo DQ2 (tabela 12: OR, 8,82; IC, 1,02-76,61), que está em desequilíbrio de ligação com DR7. O haplótipo DR7-DQ2 foi menos encontrado entre casos portadores de variantes 350G que controles na população tcheca, enquanto tendência oposta foi descrita na população italiana (ZEHBE *et al.*, 2001) e holandesa (BONTKES *et al.* 1998). Foi encontrada, na Holanda, uma maior frequência de portadores de HLA-DRB1*07 entre as portadoras de HPV-16 quando comparados ao grupo HPV negativo e controles. Contudo, este grupo não foi associado a progressão da doença. Interessantemente, a única portadora de uma variante do ramo AF-2 no estudo citado, era também portadora de DR7 e

apresentou progressão da doença, portando displasia moderada/severa ao final do estudo (BONTKES *et al.* 1998). O mesmo estudo descreveu uma maior proporção de DR7 entre portadoras de variantes 350G quando comparadas às portadores de variantes 350T. Contrariamente, o estudo de BRADY *et al.* (1999) não encontrou esta ou outras diferenças correlacionando o polimorfismo da posição 350 com os alelos HLA. O haplótipo DRB1*07-DQB1*0201 também foi previamente associado a NIC III portadores de HPV-16 na população hispânica do Novo México, ainda que neste estudo não tenha sido encontrada associação com carcinoma invasivo (APPLE *et al.*, 1995).

Um estudo descreveu a alteração do nucleotídeo da posição 350 do gene E6 (T→G) como associado a persistência viral (LONDESBOROUGH *et al.*, 1996). Posteriormente vários estudos, em sua maioria europeus, passaram a analisar esta posição gênica ou sua posição correspondente na proteína viral E6 (83^a), em que podem ser encontrados os aminoácidos leucina ou valina decorrentes da substituição citada. No presente estudo, além da variante protótipo, contribuem para o grupo 350T as variantes africanas. No grupo 350G estão principalmente as variantes asiático-americanas, além de 4 variantes semelhantes ao protótipo, mas com a mutação 350G (referidas como P350G). As OR para o grupo DR4 foram menores que a unidade em todas as comparações realizadas neste estudo e o grupo apresentou uma tendência protetora (valor marginalmente significativo) entre pacientes com CCU portadores de variantes européias. A separação de acordo com o polimorfismo da posição 350 de E6 revelou um efeito protetor deste grupo em relação às variantes 350T. Interessantemente, ZEHBE *et al.* (2001) demonstraram uma associação positiva de um haplótipo portador deste grupo (DR4-DQ3) em 3 populações européias, mas com portadoras de variantes 350G. O

mesmo haplótipo foi encontrado em maior frequência entre portadoras de variantes de E2 (TERRY *et al.*, 1997). Em conjunto, esses resultados sugerem um possível papel do polimorfismo desta posição em portadores de DR4. No entanto, estudos funcionais são necessários para verificar se ocorre interação desta região da proteína com esta molécula HLA. Estudos prospectivos também poderiam esclarecer possíveis conseqüências dessa interação, como avaliar se esta combinação esta associada a progressão de doença.

Alguns estudos de linfoproliferação mapearam regiões antigênicas entre proteínas do HPV e foram identificados potenciais epítomos para moléculas HLA de classe II em diferentes proteínas de HPV-16. TSUKUI *et al.* (1996) identificaram respostas linfoproliferativas contra peptídeos da região carboxi-terminal E7, assim como o encontrado por GRUIJL *et al.* (1998). Recentemente foram mapeadas em E7 epítomos distintos para diferentes moléculas HLA-DR (DR3 e DR7) e DQ (DQ2) (VAN DEN BURG *et al.*, 2001). As respostas a E6 foram aos peptídeos da região central e carboxi terminal desta proteína (TSUKUI *et al.*, 1996). É relevante mencionar que nesta região da proteína já foram mapeadas diferenças que ocorrem entre as variantes moleculares naturais de HPV-16. Uma delas está na posição 83, localizada na porção central da proteína, em que podem ser encontrados os aminoácidos leucina ou valina, decorrente da substituição do nucleotídeo T por um G na posição 350 deste gene. Esta e outras alterações podem conferir diferenças de antigenicidade às variantes de HPV.

Variações em epítomos de proteínas virais podem tanto alterar a ligação às moléculas HLA, quanto, no caso desta ligação ser preservada, apresentar uma superfície modificada ao receptor da célula T (TCR). Conseqüências deste tipo de alterações em LCMV (*Lymphocytic Choriomeningitis Virus*) foram reportadas em

um modelo animal por KLENERMAN e ZINKERNAGEL (1998). Estes autores verificaram que camundongos imunizados com o tipo selvagem do vírus LCMV respondem à infecção por sua variante – portadora de um epítopo de CTL alterado – com CTL específicos ao epítopo inicial. Este comportamento poderia levar a uma resposta imune ineficaz no caso de indivíduos infectados por diferentes variantes, aumentando a probabilidade de progressão de doenças.

As possíveis implicações de alterações de aminoácidos foram descritas tanto em modelos tumorais, quanto em modelos de agentes infecciosos. A substituição de um aminoácido no antígeno tumoral de classe I, AH1, resulta em aumento de estabilidade do complexo MHC-peptídeo-TCR e aumenta a expansão de células T específicas ao antígeno tumoral original (SLANSKY *et al.*, 2000). A comparação de uma linhagem de camundongo suscetível a *Leishmania* com uma resistente demonstrou que a cinética de ativação e expansão das células T é similar nas duas linhagens, observando-se, no entanto, uma diferença de afinidade pelo TCR (MALHERBE *et al.*, 2000). O papel dos resíduos de aminoácidos que participam de interações MHC-peptídeo-TCR é fundamental no estabelecimento de uma resposta imune eficaz e os dados acima sugerem que substituições destes resíduos podem resultar na perda desta resposta. As substituições podem agir em diferentes estágios, podendo alterar o padrão de clivagem das proteínas virais e impedindo a geração de peptídeos capazes de ligar ao MHC ou ainda, o peptídeo gerado pela variante pode ligar com diferente afinidade ao MHC. Outra possibilidade é que a substituição cause alterações no reconhecimento pela célula T (SLANSKY *et al.*, 2000; MALHERBE *et al.*, 2000).

No caso dos epítopos do HPV e lesões cervicais, este tipo de estudo ainda não foi realizado. No entanto, seria de fundamental importância, principalmente

para a investigação do papel das variantes moleculares naturais de HPV-16 em programas de vacinas, uma vez que a imunidade pode ser específica a alguns tipos de variantes. Existem evidências que as substituições encontradas em variantes de HPV-16 não resultam na formação de respostas humorais específicas (CHENG *et al.*, 1995) às diferentes variantes. Ensaio utilizando células de indivíduos portadores de diferentes alelos HLA frente a peptídeos das variantes naturais de HPV-16 poderiam verificar se as alterações de aminoácidos encontradas são relevantes na resposta imune celular. A implantação destes ensaios está em andamento no nosso grupo.

Os portadores de DR15 apresentaram um maior risco de serem pacientes com CCU portadores de variantes 350T. Este efeito torna-se ainda mais pronunciado ao analisarmos o alelo DRB1*1503, encontrado na maioria dos casos portadores de DR15. Este valor é semelhante ao encontrado na análise de variantes européias, sendo este ramo o que mais contribuiu no grupo 350T, uma vez que apenas uma das 7 variantes africanas encontradas é portadora de DR15 (*1503). Os valores obtidos na comparação de portadores de DR15 entre casos com variantes 350G e controles são marginalmente significativos, indicando uma tendência positiva, refletindo o efeito dos casos de CCU portadores de variantes AA – ramo que mais contribuiu ao grupo 350G (42/46).

Um estudo recente realizado por BESKOW *et al.* (2001) sugere que o papel do haplótipo DRB1*1501-DQB1*0602 estaria relacionado à inabilidade de eliminar a infecção pelo HPV, uma vez que a frequência de portadoras deste haplótipo é maior entre mulheres que apresentam infecções persistentes de longa duração pelo HPV quando comparadas as mulheres com infecções persistentes de curta duração.

As associações vistas em nosso estudo, não permitem a atribuição destas à aquisição ou eliminação da infecção por HPV ou ao desenvolvimento do CCU, uma vez que não dispomos de um grupo representativo de portadoras de HPV-16 mas livre de CCU. No entanto, uma hipótese para o papel das moléculas HLA frente ao risco de CCU pode estar relacionado a uma melhor ou pior resposta imune na eliminação viral. Esta hipótese poderia se aplicar, por exemplo, no caso de portadores do alelo DQ8 e de variantes 350T. A interação resultante levaria a uma resposta eficaz na eliminação viral, e por isso, este grupo confere um efeito protetor frente a estas variantes de HPV-16. O contrário seria esperado para portadoras de DR15: uma resposta imune ineficaz não seria capaz de eliminar o vírus e esta infecção persistente poderia aumentar o risco de desenvolvimento de CCU. Desta forma, a associação com CCU vista em nosso estudo seria decorrente da incapacidade de eliminação do HPV. No entanto, um estudo prospectivo avaliando em conjunto o papel das variantes moleculares naturais de HPV-16 e o polimorfismo dos genes HLA seria necessário para corroborar ou desafiar esta hipótese. Este estudo está sendo realizado em nosso grupo de pesquisa.

A ligação de peptídeos a células $CD4^+$ pode induzir a diferenciação seletiva destas células para Th1 ou Th2. Vários estudos sugeriram que a alteração da sequência do peptídeo se liga ao TCR pode afetar a natureza Th1 x Th2 da resposta imune resultante contra o peptídeo. Os peptídeos alterados, denominados ligantes peptídicos alterados (APL), modificam a proliferação de células T $CD4^+$ e o padrão de citocinas liberados por estes linfócitos. Em relação a resposta de um clone ao peptídeo selvagem, estes APL podem ter atividades tanto agonistas quanto antagonistas (MURRAY, 1998). Um possível papel das variantes de HPV-16 na resposta imune poderia decorrer deste fato, ou seja, algumas delas poderiam

funcionar como APL e causar respostas celulares com eficiência distinta. Evidências demonstram que a secreção preferencial de citocinas tipo Th1 (IL-2, IFN- γ e TNF- β) estão associadas com a regressão de verrugas (GRASSEGGGER *et al.*, 1997). A produção de IL-2, em resposta a peptídeos de E6 e E7 de HPV, é menor em pacientes com lesões de alto grau e carcinoma invasivo do colo uterino, comparado a mulheres com citologia normal (TSUKUI *et al.*, 1996). Por outro lado, a produção de IL-4 e IL-10 (citocinas tipo Th2) correlaciona-se com infecções por HPV que se estendem além do colo uterino (CLERICI *et al.*, 1997). Uma vez que estes estudos investigando o padrão de citocinas liberadas em resposta a antígenos do HPV não avaliaram o papel das variantes, essa investigação seria interessante para esclarecer se as variações encontradas nas proteínas virais influenciam ou não o padrão Th1/Th2, e conseqüentemente, a resposta imune.

Muitos estudos investigaram possíveis associações entre alelos e haplótipos HLA e risco de CCU ou infecção por HPV. No entanto, a comparação dos resultados pode ser difícil. Como os estudos são realizados em populações diferentes, a distribuição dos alelos e haplótipos HLA também são diferentes, sendo que nem sempre os mesmos genes são analisados. Os genes mais comumente investigados são HLA-DRB1 e DQB1, mas os métodos de análise também podem ser diferentes: os primeiros estudos utilizaram tipagens sorológicas, enquanto atualmente a maioria dos estudos utilizam métodos baseados em PCR para identificar os diferentes alelos.

Outra fonte de variação entre os diferentes estudos pode ser o tipo de lesão analisada: alguns estudos analisam casos de CCU invasivo, outros, lesões precursoras de diferentes graus. Uma outra limitação é o tamanho das amostras, sendo particularmente pequeno nos estudos mais antigos e uma importante fonte

de variação nas associações descritas. Alguns utilizavam como controles para a comparação das frequências de HLA amostras de estudos populacionais dos *workshops* de histocompatibilidade, sobre as quais não se tem informações quanto à infecção por HPV ou presença de alterações citológicas.

Frente a tais limitações, muitos resultados parecem contraditórios. No entanto, deve-se ressaltar que o CCU é uma doença de caráter multifatorial, sendo razoável supor que múltiplos genes podem participar no seu desenvolvimento. Além disso, fatores epigenéticos devem somar-se à suscetibilidade conferida por alguns genes, como por exemplo, hábitos e variáveis relacionadas ao comportamento sexual. Características virais podem também influenciar o risco de desenvolvimento desta neoplasia, não apenas na resposta imune, mas também decorrentes de uma distribuição diferencial de variantes com diferentes graus de oncogenicidade de acordo com a população.

Apesar da complexidade destas interações, os últimos anos revelam um avanço considerável na compreensão da etiopatogênese do CCU.

6. CONCLUSÕES

Este estudo identificou as variantes de HPV-16 encontradas em casos de CCU da cidade de João Pessoa. Entre os casos portadores de uma única variante de HPV-16, foram identificadas variantes dos ramos europeu (44,9%), asiático-americano (47,2%) e africano (7,9%).

Também comparamos a distribuição de alelos HLA nas amostras de CCU portadoras de diferentes variantes de HPV-16 com a distribuição num grupo controle. Identificamos ainda associações anteriormente descritas entre CCU e grupos HLA que puderam ser atribuídas a diferentes variantes de HPV-16.

Foram identificadas associações negativas de casos de carcinoma do colo uterino portadores de variantes não-européias com DQB1*05 e de portadores de variantes européias com DQB1*0302.

A associação positiva com DRB1*15 mostrou ser maior entre CCU portadores de variantes européias que não-européias.

Investigou-se também a distribuição de HLA entre portadores de variantes com a mutação no gene E6 350T, que codifica o aminoácido leucina na 83^a posição da proteína E6, e 350G, que codifica o aminoácido valina. Um efeito protetor dos alelos DRB1*04 e DQB1*0302 foi encontrado entre as portadoras de variantes 350T. Entre as portadoras de variantes com esta mutação, encontrou-se uma maior frequência de DRB1*15 quando comparada aos controles.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; MURPHY, K. M.; SHER, O.A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, v.383, p.787-793, 1996.
- AGORASTOS, T.; LAMBROPOULOS, A. F.; CONSTANTINIDIS, T. C.; KOTSIS, A.; BONTIS, J. N. p53 codon 72 polymorphism and risk of intra-epithelial and invasive cervical neoplasia in Greek woman. **Eur. J. Cancer Prev.**, v. 9, p. 113-8, 2000.
- ALLISON, J. P.; KRUMMEL, M. F. The Yin and Yang of T cell costimulation **Science**, v.270, n.5238, p.932-3, 1995.
- ANDROPHY, E. J. Molecular biology of human papillomavirus infection and oncogenesis. **J. Invest. Dermatol.**, v.103, n.2, p.248-56, 1994
- APPLE, R. J.; ERLICH, H. A.; KLITZ, W.; MANOS, M. M.; BECKER, T. M.; WHEELER, C. M. HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. **Nature Genet.**, v.6, p.157-162, 1994.
- APPLE, R. J. ; BECKER, T. M. ; WHEELER, C. M. ; ERLICH, H. A. Comparison of human leukocyte antigen DR-DQ disease associations found with cervical dysplasia and invasive cervical carcinoma. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.87, p.427-436, 1995.
- BAL, V.; MCINDOE, A.; DENTON, G.; HUDSON, D.; LOMBARDI, G.; LAMB, J.; LECHLER, R. Antigen presentation by keratinocytes induces tolerance in human T cells. **Eur. J. Immunol.**, v.20, n.9, p.1893-7, 1990
- BERTORELLE, R.; CHIECO-BIANCHI, L.; DEL MISTRO, A. Papillomavirus and p53 codon 72 polymorphism. **Int. J. Cancer**. v.82, p.616-17, 1999.
- BERUMEN, J.; ORDONEZ, R. M.; LAZCANO, E.; SALMERON, J.; GALVAN, S. C.; ESTRADA, R. A.; YUNES, E.; GARCIA-CARRANCA, A.; GONZALEZ-LIRA, G.; MADRIGAL-DE LA CAMPA, A. Asian-american variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.93, n.17, p.1325-30, 2001.
- BAUER, H. M.; TING, Y.; GREER, C. E.; CHAMBERS, J. C.; TASHIRO, C. J.; CHIMERA, J.; REINGOLD, A.; MANOS, M. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method, **JAMA**, v.265, n.4, p.472-477, 1991.
- BERNARD, H. ; CHAN, S. ; MANOS, M. M. ; ONG, C. ; VILLA, L. L. ; DELIUS, H. ; PEYTON, C. H. ; BAUER, H. M. ; WHEELER, C. M., M. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polimerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. **J. Infect. Dis.**, v.170, p.1077-1085, 1994.

- BESKOW, A. H.; JOSEFSSON, A. M.; GYLLENSTEN, U. B. HLA class II alleles associated with infection by HPV16 in cervical cancer in situ. **Int. J. Cancer**, v.93, n.6, p.817-22, 2001.
- BIGNON, J. D.; FERNANDEZ-VIÑA, M. 12th IHWC HLA class II reference protocol. In: **Twelfth International Histocompatibility Workshop and conference - Technical Handbook**, 1994.
- BODMER, J. G.; MARSH, S. G. E.; ALBERT, E. D.; BODMER, W. F.; BONTROP, R. E.; CHARRON, D.; DUPONT, B.; ERLICH, H. A.; FAUCHET, R.; MACH, B.; MAYR, W. R.; PARHAM, P.; SASAZUKI, T.; SCHREUDER, G. M. T.; STROMINGER, J. L.; TERASAKI, P. I. Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. **Eur. J. Immunogenetics**, v.24, p.105-151, 1997.
- BONTKES, H. J.; VAN DUIN, M.; DE GRUIJL, T. D.; DUGGAN-KEEN, M. F.; WALBOOMERS, J. M. M.; STUKART, M. J.; VERHEIJEN, R. H.; HELMERHORST, T. J. M.; MEIJER, C. J.; SCHEPER, R. J.; STEVENS, F. R. A.; DYER, P. A.; SINNOTT, P.; STERN, P. L. HPV 16 Infection and progression of cervical intra-epithelial neoplasia: analysis of HLA polymorphism and HPV 16 E6 sequence variants. **Int. J. Cancer**, v.78, p.166-171, 1998.
- BOSCH, F.X.; MUÑOZ, N.; de SANJOSÉ, S.; GUERRERO, E.; GAFFARI, A.M.; KALDOR, J.; CASTELLSAGUÉ, X.; SHAH, K.V. Importance of human papillomavirus endemicity in incidence of cervical cancer: an extension of hypothesis on sexual behavior. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v.3, p.375-79, 1994.
- BOSCH, F.X.; MANOS, M.M.; MUÑOZ, N.; SHERMAN, M.; JANSEN, A.M.; PETO, J.; SCHIFFMAN, M.H.; MORENO, V.; KURMAN, R.; SHAH, S.K. and THE IBSCC STUDY GROUP. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.87, p.796-802, 1995.
- BOSCH, F. X.; MUNOZ, N.; SANJOSE, S. Human papillomavirus and other risk for cervical cancer. **Biomed & Pharmacother.**, v.51, p.268-275, 1997.
- BRADY, C. S., DUGGAN-KEEN, M. F., DAVIDSON, J. A., VARLEY, J. M., STERN, P. L. Human papillomavirus type 16 E6 variants in cervical carcinoma: relationship to host genetic factors and clinical parameters. **J. Gen. Virol.**, v.80, Pt12, p.3233-40, 1999.
- CAMPBELL, R. D.; TROWSDALE, J. Map of the human MHC. **Immunol. Today**, v.14, n.7, p.349-352, 1993.
- CASTELLSAGUÉ, X.; GHAFARI, A.; DANIEL, R.W.; BOSCH, F.X.; MUÑOZ, N.; SHAH, K.V. Prevalence of penile human papillomavirus DNA in husbands of women with and without cervical neoplasia: A study in Spain and Colombia. **J. Infect. Dis.**, v.176, p.353-61, 1997.
- CHAN, S. Y.; HO, L.; ONG, C. K.; CHOW, V.; DRESCHER, B.; DUERST, M.; TER MEULEN, J.; VILLA, L.; LUANDE, J.; MGAYA, H. N.; BERNARD, H. U. Molecular variants of Human Papillomavirus 16 from four continents suggest

- ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. **J. Virol.**, v.66, p.2057-2066, 1992.
- CHAUX, P.; VANTOMME, V.; STROOBANT, V.; THIELEMANS, K.; CORTHALS, J.; LUITEN, R.; EGGERMONT, A. M. M.; BOON, T.; van der BRUGGEN, P. Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4⁺ T lymphocytes. **J. Exp. Med.**, v.189, n.5, p.767-777, 1999.
- CHENG, G.; ICENOGLE, J. P.; KIRNBAUER, R.; HUBBERT, N. L.; ST LOUIS, M. E.; HAN, C.; SVARE, E. I.; KJAER, S. K.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Divergent human papillomavirus type 16 variants are serologically cross-reactive **J. Infect. Dis.**, v.172, n.6, p.1584-7, 1995.
- CLERICI, M. ; MEROLA, M. ; FERRARIO, E. ; TRABATTONI, D. ; VILLA, M. L. ; STEFANON, B. ; VENZON, D. J. ; SHEARER, G. M. ; DE PAOLO, G. ; CLERICI, E. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.89, n.3, p.245-250, 1997.
- DAVID, A. L.; TAYLOR, G. M.; GOKHALE, D.; APLIN, J. D.; SEIF, M. W.; TINDALL, V. R. HLA-DQB1*03 and cervical intraepithelial neoplasia type III. **Lancet**, v.340, n.8810, p.52, 1992.
- DE BRUIJN, M. L. H.; SCHUURHUIS, D. H.; VIERBOOM, M. P. M.; VERMEULEN, H.; DE COCK, K. A. J.; OOMS, M. E.; RESSING, M. E.; TOEBES, M.; FRANKEN, K. L. M. C.; DRIJFHOUT, J.; OTTENHOFF, T. H. M.; OFFRINGA, R.; MELIEF, C. J. M. Immunization with Human Papillomavirus type 16 (HPV 16) oncoprotein-loaded dendritic cells as well as protein adjuvant induces MHC class I-restricted protection to HPV 16-induced tumor cells. **Cancer Res.**, v.58, p.724-731, 1998.
- DE GRUIJL, T. D.; BONTKES, H. J.; STUKART, M. J.; WALBOOMERS, J. M.; REMMINK, A. J.; VERHEIJEN, R. H.; HELMERHORST, T. J. L.; MEIJER, C. J.; SCHEPER, R. J. T cell proliferative responses against human papillomavirus 16 E7 oncoprotein are most prominent in cervical intraepithelial neoplasia patients with a persistent viral infection. **J. Gen. Virol.**, v.77, p.2183-2191, 1996.
- DYSON, N.; HOWLEY, P. M. ; MÜNGER, K. ; HARLOW, E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science**, v.243, p.934-937, 1989.
- ELLIS, J.R.M., KEATING, P.J., BAIRD, J., HOUNSELL, E.F., RENOUEF, D.V., ROWE, M., HOPKINS, D., DUGGAN-KEEN, M.F., BARTHOLOMEW, J.S., YOUNG, L.S. AND STERN, P.L. The association of an HPV16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. **Nature Med.**, v.1, p.464-470, 1995.
- EVANS, E. M. ; MAN, S. ; EVANS, A. S. ; BORYSIEWICZ, L. K. Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. **Cancer Res.**, v.57, p.2943-2950, 1997.

- FOCCHI, J.; MARTINS, N. V. Neoplasia Intra-epitelial cervical. In: Abrão, F. S. **Tratado de Oncologia genital e mamária**, Ed. Roca, 1995.
- FRANCO, E. L. Viral etiology of cervical cancer: a critique of the evidence. **Rev. Infect. Dis.**, v.13, n.6, p.1195-1206, 1991.
- FRANCO, EL. Epidemiologia do Câncer Mamário e ginecológico In: Abrão, F. S. **Tratado de Oncologia genital e mamária**, Ed. Roca, 1995.
- FRANCO, E. L. Cancer causes revisited: human papillomavirus and cervical neoplasia. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.87, n.11, p.779-780, 1995.
- FRANCO, E. L. ; VILLA, L. L. ; RUIZ, A. ; COSTA, M. C. Transmission of cervical human papillomavirus infection by sexual activity: differences between low and high oncogenic risk types. **J. Infect. Dis.**, v. 172, p. 756-763, 1995.b
- GLEW, S. S.; STERN, P. L.; DAVIDSON, J. A.; DYER, P. A. HLA antigens and cervical carcinoma. **Nature**, v.356, n.6364, p.22, 1992.
- GLEW, S. S.; DUGGAN-KEEN, M.; GHOSH, A. K.; IVINSON, A.; SINNOTT, P.; DAVIDSON, J.; DYER, P. A.; STERN, P. L. Lack of association of HLA polymorphisms with human papillomavirus-related cervical cancer. **Hum. Immunol.**, v.37, n.3, p.157-64, 1993.
- GÖTZE, D. The Major Histocompatibility System. In: GÖTZE, D. (Ed) **The Major Histocompatibility System in Man and Animals**. Berlim: Springer-Verlag., p.1-6, 1977.
- GRASSEGGGER, A. ; ROLLINGER-HOLZINGER, I. ; ZELGER, B. W. H. ; HEIM, K. ; ZWIERZINA, H. ; FRITSCH, P. O. ; HÖPFL, R. M. Spontaneous or interferon- γ -induced T-cell infiltration, HLA-DR and ICAM-1 expression in genitoanal warts are associated with TH1 or mixed TH1/TH2 cytokine mRNA expression profiles. **Arch. Derm. Res.**, v.289, p.243-250, 1997.
- GREGOIRE, L.; LAWRENCE, W. D.; KUKURUGA, D.; EISENBREY, A. B.; LANCASTER, W. D. Association between HLA-DQB1 alleles and risk for cervical cancer in African-American women. **Int. J. Cancer**, v.57, n.4, p.504-7, 1994.
- FRISCH, M.; BIGGAR, R. J.; GOEDERT, J. J. Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.92, n.18, p.1500-10, 2000.
- HALLEZ, S.; DETREMMERIE, O.; GIANNOULI, C.; THIELEMANS, K.; GAJEWSKI, T. F.; BURNY, A. Interleukin-12-secreting human papillomavirus type 16-transformed cells provide a potent cancer vaccine that generates E7-directed immunity. **Int. J. Cancer**, v.81, p.428-437, 1999.
- HEMMINKI, K. ; DONG, C. ; VAITTINEN, P. Familial risks in cervical cancer: is there a hereditary component? **Int. J. Cancer**, v. 82, p. 775-781, 1999.
- HELLAND, A.; BORRESEN, A. L.; KAERN, J.; RONNINGEN, K. S.; THORSBY, E. HLA antigens and cervical carcinoma. **Nature**, v.356, n.6364, p.23, 1992.

- HILDESHEIM, A.; REEVES, W. C.; BRINTON, L. A.; LAVERY, C.; BRENES, M.; DE LA GUARDIA, M. E.; GODOY, J.; RAWLS, W. E. Association of oral contraceptive use and human papillomaviruses in invasive cervical cancers. **Int. J. Cancer**, v.45, n.5, p.860-4, 1990.
- HILDESHEIM, A.; SCHIFFMAN, M. ; SCOTT, D. R. ; MARTI, D. ; KISSNER, T. ; SHERMAN, M. E. ; GLASS, A. G. ; MANOS, M. M. ; LORINCZ, A. T. ; KURMAN, R. J. ; BUCKLAND, J. ; RUSH, B. ; CARRINGTON, M. Human leukocyte antigen class I/II alleles and development of human papillomavirus-related cervical neoplasia: results from a case-control study conducted in the United States. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v.7, p.1035-1041, 1998.
- HO, L.; CHAN, S.Y.; CHOW, V.; CHONG, T.; TAY, S.; VILLA, L.L.; BERNARD, H.U. Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree. **J. Clin. Microbiol.**, v.29, p.1765-72, 1991.
- HO, L., CHAN S. Y.; BURK, R. D.; DAS, B. C.; FUJINAGA, K.; ICENOGLE, J. P.; KAHN, T.; KIVIAT, N.; LANCASTER, W.; MAVROMARA-NAZOS, P.; LABROPOULOU, V.; MITRANI-ROSENBAUM, S.; NORRILD, B.; PILLAI, M. R.; STOERKER, J.; SYRJAENEN, K.; TAY, S. K.; VILLA, L. L.; WHEELER, C. M.; WILLIAMSON, A. L.; BERNARD, H. U. 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.**, v. 67, p. 6413-6423, 1993.
- HUNG, K. ; HAYASHI, R. ; LAFOND-WALKER, A. ; LOWESTEIN, C. ; PARDOLL, D. ; LEVITSKY, H. The central hole of CD4⁺ T cells in the antitumor immune response. **J. Exp. Med.**, v.188, n.12, p.2357-2368, 1998.
- JACOBS, N.; GIANNINI, S. L.; DOYEN, J.; BAPTISTA, A.; MOUTSCHEN, M.; BONIVER, J.; DELVENNE, P. Inverse modulation of IL-10 and IL-12 in the blood of women with preneoplastic lesions of the uterine cervix. **Clin. Exp. Immunol.**, v.111, p.219-224, 1998.
- JUNES, K. S.; Variabilidade Intratípica de HPV 16 e 18 em Carcinomas do Colo do Útero em uma Área de Alto Risco para o Câncer Cervical. Belém, 2000. 95p **Dissertação de Mestrado** – Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará e Museu Paraense Emílio Goeldi.
- KADISH, A. S.; HO, G. Y.; BURK, R. D.; WANG, Y.; ROMNEY, S. L.; LEDWIDGE, R.; ANGELETTI, R. H. Lymphoproliferative responses to human papillomavirus (HPV) type 16 proteins E6 and E7: outcome of HPV infection and associated neoplasia. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.89, n.17, p.1285-1293, 1997.
- KAMMER, C.; WARTHORST, U.; TORREZ-MARTINEZ, N.; WHEELER, C. M.; PFISTER, H. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97promoter activity. **J. Gen. Virol.**, v.81, n.8, p.1975-81, 2000.

- KERSH, G. J.; ALLEN, P. M. Essential flexibility in the T-cell recognition of antigen. **Nature**, v. 380, n.6574, p.495-8, 1996.
- KLAES, R.; RIDDER, R.; SCHAEFER, U.; BENNER, A.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M. No evidence of p53 allele-specific predisposition in human papillomavirus-associated cervical cancer. **J. Mol. Med.**, v. 77, p.299-302, 1999.
- KLENERMAN, P.; ZINKERNAGEL, R. M. Original antigenic sin impairs cytotoxic T lymphocyte responses to viruses bearing variant epitopes. **Nature**, v. 394, n.6692, p.482-5, 1998.
- KWOK, W. W.; DOMEIER, M. E.; JOHNSON, M. L.; NEPOM, G. T.; KOELLE, D. M. HLA-DQB1 codon 57 is critical for peptide binding and recognition. **J. Exp. Med.**, v.183, n.3, p.1253-8, 1996.
- LANHAM, S.; CAMPBELL, I.; WATT, P.; GORNALL, R. p53 polymorphism and risk of cervical cancer. **Lancet**, v.352, n.9140, p.1631, 1998.
- LONDESBOROUGH, P.; HO, L.; TERRY, G.; CUZICK, J.; WHEELER, C.; SINGER, A. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. **Int. J. Cancer**, v. 69, p.364-68, 1996.
- LOWY, D. R.; KIRNBAUER, R. ; SCHILLER, J. T. Genital human papillomaviruses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 2436-2440, 1994.
- LUXTON, J. C.; ROWE A. J.; CRIDLAND, J. C.; COLETART, T.; WILSON, P. SHEPHERD, P. S. Proliferative T cell responses to human papillomavirus type 16 E7 protein in women with cervical dysplasia and cervical carcinoma and in the healthy individuals. **J. Gen. Virol.**, v.77, p.1585-1593, 1996.
- MACIAG, P. C.; SCHLECHT, N. F.; SOUZA, P. S. A.; FRANCO, E. L.; VILLA, L. L.; PETZL-ERLER, M. L. Major histocompatibility complex class II polymorphisms and risk of cervical cancer and human papillomavirus infection in Brazilian women. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.**, v.9, p.1183-1191, 2000.
- MACIAG PC, VILLA LL Genetic susceptibility to HPV infection and cervical cancer. **Braz J Med Biol Res.**, v.32, n.7,p.915-22, 1999.
- MALHERBE, L.; FILIPPI, C.; JULIA, V.; FOUCRAS, G.; MORO, M.; APPEL, H.; WUCHERPFENNIG, K.; GUERY, J. C.; GLAICHENHAUS, N. Selective activation and expansion of high-affinity CD4⁺ T cells in resistant mice upon infection with *Leishmania major*. **Immunity**, v.13, n.6, p.771-82, 2000.
- MAKNI, H.; FRANCO, E. L.; KAIANO, J.; VILLA, L. L.; LABRECQUE, S.; DUDLEY R.; STOREY, A.; MATLASHEWSKI, G. p53 polymorphism in codon 72 and risk of human papillomavirus-induced cervical cancer: effect of inter-laboratory variation. **Int. J. Cancer**, v. 87, p. 528-33, 2000.
- MATLASHEWSKI, G.; OSBORN, K.; BANKS, L.; STANLEY, M.; CRAWFORD, L. Transformation of primary human fibroblast cells with human papillomavirus type 16 DNA and EJ-ras. **Int. J. Cancer**, v.42, n.2, p.232-238, 1988.

- MEHAL, W. Z.; LO, Y. M.; HERRINGTON, C. S.; EVANS, M. F.; PAPADOPOULOS, M. C.; ODUNIS, K.; GANESAN, T. S.; MCGEE, J. O.; BELL, J. I.; FLEMING, K. A. Role of human papillomavirus in determining the HLA associated risk of cervical carcinogenesis. **J. Clin. Pathol.**, v.47, n.12, p.1077-81, 1994.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. **Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil-2000**. Rio de Janeiro: INCa; 2000. (<http://www.inca.org.br/epidemiologia/estimativa2001/index.html>)
- MORAES, M. E.; FERNANDEZ-VINA, M.; SALATIEL, I.; TSAI, S.; MORAES, J. R.; STASTNY, P. HLA class II DNA typing in two Brazilian populations. **Tissue Antigens**, v.41, n.5, p.238-42, 1993.
- MOSS, D. J.; KHANNA, R. Major histocompatibility complex: from genes to function. **Immunol. Today**, v.20, n.4, p.165-67, 1999.
- MUÑOZ, N.; BOSH, F. X. The causal link between HPV and cervical cancer and its implications for prevention of cervical cancer. **Bulletin of PAHO**, v.30, n.4, p.362-377, 1996.
- MURAKAMI, M.; GURSKI, K. J.; MARINCOLA, F.M.; ACKLAND, J.; STELLER, M. A. Induction of specific CD8+ T-lymphocyte responses using a human papillomavirus-16 E6/E7 fusion protein and autologous dendritic cells. **Cancer Res.**, v.59, p.1184-1187, 1999.
- MURRAY, J. S. How the MHC selects Th1/Th2 immunity. **Immunol Today**, v.19, n.4, p.157-63, 1998.
- MYERS, G.; DELIUS, H.; ICENOGLE, J. Human Papillomaviruses. **A compilation and analysis of nucleic acid and aminoacid sequences**. Los Alamos National Laboratory, 1995.
- NAWA, A.; NISHIYAMA, Y.; KOBAYASHI, T.; WAKAHARA, Y.; OKAMOTO, T.; KIKKAWA, F.; SUGANUMA, N.; GOTO, S.; KUZUYA, K.; TOMODA, Y. Association of human leukocyte antigen-B1*03 with cervical cancer in Japanese women aged 35 years and younger. **Cancer**, v.75, n.2, p.518-21, 1995.
- NIMAKO, M.; FIANDER, A. N.; WILKINSON, G. W. G.; BORYSIEWICZ, L. K.; MAN, S. Human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade III. **Cancer Res.**, v.57, p.4855-4861, 1997.
- NINDL, I.; RINDFLEISCH, K.; LOTZ, B.; SCHNEIDER, A.; DÜRST, M. Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer. **Int. J. Cancer**, v.82, p.203-7, 1999.
- NINDL, I.; ZUMBACH, K.; PAWLITA, M.; TELLER, K.; SCHNEIDER, A.; DURST, M. Absence of antibody against human papillomavirus type 16 E6 and E7 in patients with cervical cancer is independent of sequence variations. **J. Infect. Dis.**, v.181, n.5, p.1764-7, 2000.

- O'CONNOR, M.; CHAN, S.Y.; BERNARD, H.U. Transcription factor binding sites in the LCR of genital HPVs. In: Myers, G. *et al.* Human Papillomaviruses. **A compilation and analysis of nucleic acid and aminoacid sequences**. Los Alamos National Laboratory, p. III 21-41, 1995.
- O'GARRA, A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. **Immunity**, v.8, n.3, p.275-83, 1998.
- ODUNSI, K.; TERRY, G.; HO, L.; BELL, J.; CUZICK, J.; GANESAN, T.S. Susceptibility to human papillomavirus-associated cervical intra-epithelial neoplasia is determined by specific HLA DR-DQ alleles. **Int. J. Cancer**, v.67, p.595-602, 1996.
- PASETTO, N.; SESTI, F.; SANTIS, L.P.; PICCIONE, E.; NOVELLI, G.; DALLAPICCOLA, B. The prevalence of HPV 16 DNA in normal and pathological cervical scrapes using the polimerase chain reaction. **Gynecol. Oncol.**, v.29, p.573-77, 1992.
- PETRY, K. U.; SCHEFFEL, D.; BODE, U.; GABRYSIK, T.; KÖCHEL, H.; KUPSCH, E.; GLAUBITZ, M.; NIESERT, S.; KÜHNLE, H.; SCHEDEL, I. Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions. **Int. J. Cancer**, v.57, p.836-840, 1994.
- PETZL-ERLER, M. L. Genetics of the immune responses and disease susceptibility. **Ciência e Cultura**, v.51, n.3-4, p.199-211, 1999.
- RAPP, L.; CHEN, J. The papillomavirus E6 proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1378, p.F1-9, 1998.
- REINER, S. L. Helper T cell differentiation, inside and out. **Curr Opin Immunol**, v.3, n.3, p.351-5, 2001.
- ROSENTHAL, A. N.; RYAN, A.; AL-JEHANI, R. M.; STOREY, A.; HARWOOD, C. A.; JACOBS, I. J. p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical cancer in UK. **Lancet**, v. 352, p. 871-72, 1998.
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.S.; HIGUCHI, H.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, p.487-97, 1988.
- SANJEEVI, C. B. ; HJELMSTRÖM, P. ; HALLMANS, G. ; WIKLUND, F. ; LENNER, P. ; ANGSTRÖM, T. ; DILLNER, J. ; LERNMARK, A. Different HLA-DR-DQ haplotypes are associated with cervical intraepithelial neoplasia among human papillomavirus type-16 seropositive and seronegative swedish women. **Int. J. Cancer**, v. 68, p. 409-414, 1996.
- SASTRE-GARAU, X.; LOSTE, M. N.; VINCENT-SALOMON, A.; FAVRE, M.; MOURET, E.; ROCHEFORDIERE, A. DE LA ; DURAND, J. C. ; TARTOUR, E.; LEPAGE, V.; CHARRON, D. Decreased frequency of HLA-DRB1*13 alleles in frenchwomen with HPV-positive carcinoma of the cervix. **Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)**, v. 69, p. 159-164, 1996.
- SEEDORF, K.; KRÄMER, G.; DÜRST, M.; SUHAI, S.; RÖWEKAMP, W.G. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. **Virology**, v.145, p.181-85, 1985.

- SHEPHERD, P. S.; TRAN, T. T. T.; ROWE, A. J.; CRIDLAND, J. C.; COMEFORD, S. A.; CHAPMAN, M. G.; RAYFIELD, L. S. T cell responses to the human papillomavirus type 16 E7 protein in mice of different haplotypes. **J. Gen. Virol.**, v. 73, p. 1269-1274, 1992.
- SCHEFFNER, M.; MÜNGER, K.; BYRNE, J.C.; HOWLEY, P.M. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p. 5523-27, 1991.
- SCHEFFNER, M.; HUIBREGTSE, J.M.; VIERSTRA, R.D.; HOWLEY, P.M. The HPV-16 E6 and E6-AP Complex Functions as a Ubiquitin-Protein Ligase in the Ubiquitination of p53. **Cell**, v.75, p.495-505, 1993.
- SCHIFFMAN, M. H., Recent progress in definig the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.84, n.6, p.394-398, 1992.
- SCHIFFMAN, M. H.; BAUER, H. M.; HOOVER, R. N.; GLASS, A. G.; CADELL, D. M.; RUSH, B. B.; SCOTT, D. R.; SHERMAN, M. E.; KURMAN, R. J.; WACHOLDER, S.; STANTON, C. K.; MANOS, M. M. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 85, n. 12, p. 958-964, 1993.
- SCHLEGEL, R.; PHELPS, W. C.; ZHANG, Y-L.; BARBOSA, M. Quantitative keratinocyte assay detects two biological activities of human papillomavirus DNA and identifies viral types associated with cervical carcinoma. **EMBO**, v. 7, n. 10, p. 3181-3187, 1988.
- SLANSKY, J. E.; RATTIS, F. M.; BOYD, L. F.; FAHMY, T.; JAFFEE, E. M.; SCHNECK, J. P.; MARGULIES, D. H.; PARDOLL, D. M. Enhanced antigen-specific antitumor immunity with altered peptide ligands that stabilize the MHC-peptide-TCR complex. **Immunity**, v.13, n.4, p.529-38, 2000
- SLOAN-LANCASTER, J.; EVAVOLD, B. D.; ALLEN, P. M. Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells. **Nature**, v.363, n.6425, p.156-9, 1993.
- SONODA, Y.; SAIGO, P. E.; BOYD, J. p53 and genetic susceptibility to cervical cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.91, n.6, p.557, 1999.
- STÖPPLER, M.C.; CHING, K.; STÖPPLER, H.; CLANCY, K.; SCHLEGEL, R.; ICENOGLE, J. Natural variants of human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. **J Virol.**, v.70, p.6987-6993, 1996.
- STOREY, A.; THOMAS, M; KALITA, A; HARWOOD, C; GARDIOL, D; MANTOVANI, F; BREUER, J; LEIGH, IM; MATLASHEWSKI, G; BANKS, L. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. **Nature**, v.393, p.229-33, 1998.
- SVEJGAARD, A.; RYDER, L. P. HLA and disease association: detecting the strongest association. **Tissue Antigens**, v.43, p.18-27, 1994.

- TERRY, G.; HO, L.; CUZICK, J. Analysis of E2 amino acid variants of human papillomavirus types 16 and 18 and their associations with lesion grade and HLA DR/DQ type. **Int. J. Cancer**; v.73, n.5, p.651-5, 1997
- TING, Y. & MANOS, M. Detection and typing of genital human papillomaviruses. In: Innis, M.A.*et al.* **PCR protocols. A guide to methods and applications**. Academic Press, Inc. 356-59, 1990.
- TOES, R. E. M. ; OSSENDORP, F. ; OFFRINGA, R. ; MELIEF, C. J. M. CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. **J. Exp. Med.**, v.189, n.5, p.753-756, 1999.
- TSUKUI, T.; HILDESHEIM, A.; SCHIFFMAN, M. H.; LUCI III, J.; CONTOIS, D.; LAWLER, P.; RUSH, B. B.; LORINCZ, A. T.; CORRIGAN, A. , BURK, R. D.; QU, W. ; MARSHALL, M. A. ; MANN, D. ; CARRINGTON, M. ; CLERICI, M.; SHEARER, G. M.; CARBONE, D. P.; SCOTT, D. R.; HOUGHTEN, R. A.; BERZOFKY, J. A. Interleukin 2 production *in vitro* by peripheral lymphocytes in response to human papillomavirus-derived peptides: correlation with cervical pathology. **Cancer Res.**, v.56, p.3967-3974, 1996.
- VAN DEN BRULE, A.; MEIJER, C.; BARKELS, V.; KENEMANS, P.; WALBOOMERS, J. Rapid Detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v.28, p.2739-43, 1990.
- VAN DER BURG S. H.; RESSING, M. E.; KWAPPENBERG, K. M.; DE JONG, A.; STRAATHOF, K.; DE JONG, J.; GELUK, A.; VAN MEIJGAARDEN, K. E.; FRANKEN, K. L.; OTTENHOFF, T. H.; FLEUREN, G. J.; KENTER, G.; MELIEF, C. J.; OFFRINGA, R. Natural T-helper immunity against human papillomavirus type 16 (HPV16)E7-derived peptide epitopes in patients with HPV16-positive cervical lesions: identification of 3 human leukocyte antigen class II-restricted epitopes. **Int. J. Cancer**, v.91, n.5, p.612-8, 2001.
- VANDENVELDE, C.; DE FOOR, M.; VAN BEERS, D. Precision about the association between cervical carcinoma and HLA-DQB1*03 alleles. **Lancet**, v.342, n.8870, p.553, 1993.
- VAN DUIN, M.; SNIJDERS, P. J.; VOSSEN, M. T.; KLAASSEN, E.; VOORHORST, F.; VERHEIJEN, R. H.; HELMERHORST, T. J.; MEIJER, C. J.; WALBOOMERS, J. M. Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. **J. Gen. Virol.**, v. 2, p. 317-25, 2000.
- VAN RANST, M.; TACHEZY, R.; BURK, R. D. Human papillomavirus: a neverending story? In: LACEY, D. ed. **Papillomavirus reviews: Current research on papillomaviruses**. Leeds Medical Information, 315p. 1996.
- VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMOM, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. **Virus taxonomy: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Virus**. Academic Press, 1999.

- VERESS, G.; SZARKA, K.; DONG, X. P.; GERGELY, L.; PFISTER, H. Functional significance of sequence variations in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. **J. Gen. Virol.**, v.80, n.4, p.1035-43, 1999.
- VILLA, L.L. Human papillomaviruses and cervical cancer. **Adv. Cancer Res.**, p.321-41, 1997.
- VILLA, L. L.; SICHERO, L.; RAHAL, P.; CABALLERO, O.; FERENCZY, A.; ROHAN, T.; FRANCO, E. L. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. **J. Gen. Virol.**, v.81, p.2959-2968, 2000.
- VILLADANGOS, J. A.; PLOEGH, H. L. Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge? **Immunity**, v.12, p.233-239, 2000.
- XI, L. F.; DEMERS, W.; KOUTSKY, L. A.; KIVIAT, N. B.; KUYPERS, J.; WATTS, D. H.; HOLMES, K. K.; GALLOWAY, D. A. Analysis of human papillomavirus type 16 variants indicates establishment of persistent infection. **J. Infect. Dis.**, v.172, p.747-55, 1995
- XI, L. F.; KOUTSKY, L. A.; GALLOWAY, D. A.; KUYPERS, J.; HUGHES, J. P.; WHEELER, C. M.; HOLMES, K. K.; KIVIAT, N. B. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.89, n.11, p. 796-802, 1997.
- WALBOOMERS, J.M.; JACOBS, M.V.; MANOS, M.M.; BOSCH, F.X.; KUMMER, J.A.; SHAH, K.V.; SNIJDERS, P.J.; PETO, J.; MEIJER, C.J.; MUNOZ, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J. Pathol.**, v. 1, p. 12-9, 1999.
- WANK, R.; MEULEN, J. T.; LUANDE, J.; EBERHARDT, H. C.; PAWLITA, M. Cervical intraepithelial neoplasia, cervical carcinoma, and risk for patients with HLA-DQB1*0602, *0301, *0303 alleles. **Lancet**, v.341, n.8854, p.1215, 1993.
- WANK, R. ; THOMSEN, C. High risk of squamous cell carcinoma of the cervix for women with HLA-DQw3. **Nature**, v. 352, p. 723-725, 1991.
- WERNES, B. A. ; LEVINE, A. J. ; HOWLEY, P. M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. **Science**, v.248, p.76-79, 1990.
- WHEELER, M. C.; YAMADA, T.; HILDESHEIM, A.; JENISON, S. A. Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization. **J. Clin. Microbiol**, v.35, n., p.11-19, 1997.
- WOOLF, B.; On estimating the relation between blood group and disease. **Am. Hum. Genet.**, v.19, p.251-253, 1955.
- WU, T. C.; GUARNIERI, F. G.; STAVELEY-O'CARROLL, K. F.; VISCIDI, R. P.; LEVITSKY, H. I.; HEDRICK, L.; CHO, K. R.; AUGUST, J. T.; PARDOLL, D. M. Engineering an intracellular pathway for major histocompatibility complex class II presentation of antigens. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v.92, n.25, p.11671-5, 1995

- YAMADA, T.; MANOS, M. M.; PETO, J.; GREER, C. E.; MUNOZ, N.; BOSCH, F. X.; WHEELER, C. M. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwid perspective. **J. Virol.**, v.71, n.3, p.2463-2472, 1997.
- YAMADA, T.; WHEELER, C. M.; HALPERN, A. L.; STEWART, A. M.; HILDESHEIM, A.; JENISON, S. A. Human papillomavirus type 16 variant llineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. **J. Virol.**, v.69, n.3, p.7743-7753, 1995.
- YEWDELL, J. W.; BENNINK, J. R. Cut and trim: generating MHC class I peptide ligands. **Curr. Opin. Immunol.**, v.13, n.1, p.13-8, 2001.
- ZAR, J. H.; The Fischer exact test. In: _____. Bioestatistical analysis. 1 ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, Inc., p.291-295, 1974.
- ZEHBE, I.; WILANDER, E.; DELIUS, H.; TOMMASINO, M. Human papillomavirus16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. **Cancer Res.**, v.58, p.829-833, 1998a.
- ZEHBE, I.; VOGLINO, G.; DELIUS, H.; WILANDER, E.; TOMMASINO, M. Risk of cervical cancer and geographical variations of human papillomavirus16 E6 polymorphisms. **The Lancet.**, v.352, p.1441-2, 1998b.
- ZEHBE, I.; VOGLINO, G.; DELIUS, H.; WILANDER, E.; GENTA, F.; TOMMASINO, M. Codon 72 polymorphism of p53 and its association with cervical cancer. **The Lancet.**, v.354, p.218, 1999.
- ZEHBE, I.; TACHESI, R.; MYTILINEOS, J.; VOGLINO, G.; MIKYSKOVA, I.; DELIUS, H.; MARONGIU, A.; GISSMANN, L.; WILANDER, E.; TOMMASINO, M. Human papillomavirus 16 E6 polymorphism in cervical lesions from different European populations and their correlation with human leukocyte antigen class II haplotypes. **Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)**, Publicação Online: 30 Aug 2001.
- ZHOU, J.; FRAZER, I. H. Papovaviridae: capsid structure and capsid protein function. in: Lacey C.; editor. **Papillomavirus reviews: current research on papillomavirus**. London: Leeds University Press; p.93-100, 1996.
- ZINKERNAGEL, R. M.; EHL, S.; AICHELE, P.; OEHEN, S.; KÜNDIG, T.; HENGARTNER, H. Antigen localization regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. **Immunol. Rev.**,v.156, p.199-209, 1997.
- ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancer. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1288, p.F55-F78, 1996.