Universidade de São Paulo

Data:	13 / 09 / 05
Lilacs:	Sim - 0
Dedalus:	148664L
MFN:	27097
Terminal:	on

Instituto de Química

*Variabilidade Intratípica de HPV-16 em Relação à
Origem Étnica e HLA de uma População de Alto Risco
para o Câncer do Colo do Útero*

Katiana de Sales Junes

Tese de Doutorado

Orientadora: Luisa Lina Villa

São Paulo

20/04/2005

T
574.88
J95v

INSTITUTO DE QUÍMICA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011166

Ficha Catalográfica

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

Junes, Katiana de Sales
J95v Variabilidade intratípica de HPV-16 em relação à origem
étnica e HLA de uma população de alto risco para o câncer
do colo do útero / Katiana de Sales Junes. - São Paulo,
2005.
135p

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Villa, Luisa Lina

I. Biologia molecular 2. Colo uterino : Câncer 3. Câncer :
Imunologia I. T. II. Villa, Luisa Lina, orientador

574.88 CDD

“Variabilidade intratípica de HPV-16 em relação à origem étnica e HLA de uma população de alto risco para o câncer do colo do útero”

KATIANA DE SALES JUNES

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovado(a) por:

Profa. Dra. LUISA LINA VILLA
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. ANNA CARLA RENATA KREPEL GOLDBERG
IQ – USP

Prof. Dr. EMMANUEL DIAS NETO
FM – USP

Prof. Dr. JOSÉ ELUF NETO
FM – USP

Prof. Dr. EDISON LUIZ DURIGON
ICB – USP

SÃO PAULO
04 DE AGOSTO 2005

Quem é este que faz o mar se acalmar
E a tempestade obedece a sua voz?

Quem é este que anda sobre as águas
E por onde passa tudo pode transformar?

Quem é este que todas as coisas pode ver
E o coração do homem pode sondar?

Quem é este que cura as doenças
E o corpo e a alma pode restaurar?

(Lc 8.22-25; Mt 14.22-33; Mt 11.5.)

À minha família querida...Que agora é maior
Minha doce mãe Maria e os meus irmãos Dal e Lú
My loving husband Tristan

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as coisas...a Tua presença é o meu sustento, a Tua palavra o meu alimento pra superar todas as adversidades.

À minha mãe, Maria, mesmo estando distante uma da outra estamos sempre tão juntas e isso é de um prazer incomparável. Te amo mãe e te agradeço muito por tanto amor e dedicação. Aos meus maninhos, Dal e Lú e ao tio Pão-Pi. Pelo apoio, conselhos e o amor que há entre nós.

For my Tristan, there would be no such words to describe the many ways you have changed my life. You helped me to make it through being so understanding and most importantly being just as much in love with me as I am with you. Thank you for show me what love is all about.

À minha orientadora, Luisa Villa, pelo carinho e por ter me dado esta grande oportunidade que mudou a minha vida em todos os sentidos.

Ao grupo da virologia, pelos 7 anos de intenso e divertido convívio. Vou levar um poquinho de cada um de vocês no meu coração.

À Paty e o Fabio P., pelos 6 anos de casamento (bodas de ferro!!), pela amizade e apoio que vocês têm me dado. Vou guardá-los no meu coração as lembranças jamais mudarão.

Ao papai Paulo Maciag, pelos conselhos e amizade. Pela grande colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À Neide, pela amizade, conselhos e franqueza ...mulher virtuosa quem a achará? Pois o seu valor muito excede ao de jóias preciosas...Prov. 31:10.

À Stella, pela amizade, carinho e extrema eficiência.

A todos os amigos do Ludwig que contribuíram com valiosas sugestões.

Ao Instituto Ludwig na pessoa do Prof. Dr. Ricardo Brentani.

Aos Dr. Sidney Santos, Diogo Meyer e Bernardo Bertoni, pelas dicas e colaboração na análise dos microssatélites.

À Anna Christina e ao Fabrício Carvalho pela ajuda durante a tipagem das STR.

À FAPESP pelo apoio financeiro e a pós da química pela grande ajuda.

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	8
ABREVIATURAS	10
RESUMO.....	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 O CÂNCER DO COLO DO ÚTERO E O PAPILOMAVIRUS HUMANO	14
1.1.1 Epidemiologia.....	14
1.1.2 Organização Genômica dos Papilomavírus	15
1.1.3 Potencial Oncogênico dos HPV.....	18
1.1.4 História Natural da Infecção por HPV.....	19
1.1.5 Diversidade Genômica dos PV.....	21
1.1.6 Variantes Moleculares de HPV-16 e 18.....	22
1.1.7 Variabilidade Intratípica do HPV-16 Associada ao Risco de Neoplasia Cervical.....	25
1.2 O SISTEMA HLA.....	28
1.2.1 Associação entre Genótipos de HLA e a Infecção por HPV.....	31
1.3 POLIMORFISMOS DE DNA E ESTUDOS POPULACIONAIS	32
1.3.1 Polimorfismos de DNA Nuclear.....	32
1.3.2 Polimorfismos do DNA mitocondrial (mtDNA)	33
1.3.3 Diferenciação Étnica de Populações	34
1.4 OBJETIVOS	37
2. MATERIAIS E MÉTODOS	38
2.1 AMOSTRAS CLÍNICAS.....	38
2.1.1 Coleta das Amostras	39
2.2 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DA LCR VIRAL.....	39
2.3 ANÁLISE DE VARIANTES DO GENE E6 DE HPV-16 POR HIBRIDIZAÇÃO EM PONTOS.....	40
2.4 POLIMORFISMOS DE DNA UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DA ORIGEM ÉTNICA DA POPULAÇÃO DE BELÉM	42
2.4.1 Tipagem dos Segmentos do mtDNA	42
2.4.2 Amplificação das STR.....	42
2.5 TIPAGEM DOS GENES HLA	43
2.5.1 Amplificação do Gene HLA-DQB1	43
2.5.2 Amplificação do gene HLA-DRB1	44
2.5.3 Hibridização dos Genes HLA	45
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
2.6.1 No Estudo de Associação dos Genes HLA com o CCU	47
2.6.2 Nas Estimativas de Contribuição Étnica	48
3. RESULTADOS	50
3.1 VARIANTES DE HPV-16.....	50
3.1.1 Distribuição das Variantes da LCR de HPV-16	50
3.1.2 Análise do Polimorfismo na Posição 350 do Gene E6 de HPV-16.....	53
3.2 ANÁLISE DO MTDNA	53
3.2.1 Estimativa de Mistura Interétnica Baseada no mtDNA	55
3.3 ANÁLISE DA ESTRUTURA GENÉTICA POR STR.....	59
3.3.1 Empregando Frequências Genotípicas da População Híbrida.....	65
3.3.2 Empregando Frequências alélicas das Populações Híbrida e Parentais.....	66
3.4 ANÁLISE DOS GENES HLA-DQB1 E HLA-DRB1 E O DESENVOLVIMENTO DE CCU	67
3.4.1 Análise dos Genes HLA-DQB1 e HLA-DRB1 e as Variantes Moleculares de HPV-16	96

4. DISCUSSÃO	107
4.1 ESTUDOS DO TIPO CASO-CONTROLE <i>VERSUS</i> ETNIA	107
4.2 ASSOCIAÇÕES ENTRE HLA DE CLASSE II E CCU	109
4.3 VARIANTES DE HPV-16 E HLA DE CLASSE II NO DESENVOLVIMENTO DE CCU	115
5. CONCLUSÃO	123
6. REFERÊNCIAS.....	125

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. MAPA FÍSICO DO GENOMA DO HPV-16	17
FIGURA 2. ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS HPV-16 E HPV-18.	23
FIGURA 3. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS MOLÉCULAS HLA DE CLASSE I E II.	30
FIGURA 4. FREQUÊNCIA DOS HAPLOGRUPOS DO MTDNA OBSERVADOS NAS AMOSTRAS DE BELÉM.	56
FIGURA 5. CONTRIBUIÇÃO ÉTNICA DE ACORDO COM O MTDNA ENTRE CASOS E CONTROLES.....	58
FIGURA 6. COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DAS STR D3S1358, VWA, FGA E D8S1179 ENTRE AMOSTRAS NORMAIS E DE CCU E NIC III.....	62
FIGURA 7. COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DAS STR D21S11, D18S51, D5S818, D13S317 E D7S820 ENTRE AMOSTRAS NORMAIS E DE CCU E NIC III.....	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. PADRÃO DE SUBSTITUIÇÃO NUCLEOTÍDICA DAS VARIANTES DA LCR DE HPV-16 ENCONTRADAS EM BELÉM (PA).....	51
TABELA 2. FREQUÊNCIA DAS VARIANTES DA LCR DE HPV-16 NAS AMOSTRAS DE NIC III E CCU.....	52
TABELA 3. HAPLÓTIPOS E HAPLOGRUPOS MITOCONDRIAIS OBSERVADOS NAS AMOSTRAS DE BELÉM.	54
TABELA 4. HAPLÓTIPOS MITOCONDRIAIS DE AMOSTRAS AGRUPADAS COMO NÃO A-D.	55
TABELA 5. DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE 9 STR NOS CASOS DE CCU E NIC III.	60
TABELA 6. DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE 9 STR NOS CONTROLES.....	61
TABELA 7. ANÁLISE POR <i>LOCUS</i> DO EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG ENTRE CASOS E CONTROLES.	64
TABELA 8. DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA NA POPULAÇÃO DE BELÉM.....	65
TABELA 9. PROPORÇÕES DE ANCESTRALIDADE DO DNA NUCLEAR E MTDNA	67
TABELA 10. DISTRIBUIÇÃO SÓCIO-DEMOGRÁFICA NO ESTUDO CASO-CONTROLE.	69
TABELA 11. RAZÕES DE CHANCES (OR) E INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (IC) PARA CCU DE ACORDO COM HLA-DRB1.....	70
TABELA 12. RAZÕES DE CHANCES (OR) E INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (IC) PARA CCU DE ACORDO COM HLA-DQB1.	72
TABELA 13. RAZÕES DE CHANCES (OR) E INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (IC) PARA CCU HPV-16 POSITIVOS DE ACORDO COM HLA-DRB1.....	75
TABELA 14. RAZÕES DE CHANCES (OR) E INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (IC) PARA CCU HPV-16 POSITIVOS DE ACORDO COM HLA-DQB1.....	77
TABELA 15. RAZÕES DE CHANCES (OR) E INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (IC) PARA CCU DE ACORDO COM OS HAPLÓTIPOS HLA-DRB1-DQB1.	79
TABELA 16. RAZÕES DE CHANCES (OR) E INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (IC) PARA CCU DE ACORDO COM OS HAPLÓTIPOS HLA-DRB1-DQB1.	82
TABELA 17. RAZÕES DE CHANCES (OR) E INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (IC) PARA POSITIVIDADE DE HPV DE ACORDO COM HLA-DQB1.....	87
TABELA 18. RAZÕES DE CHANCES (OR) E INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (IC) PARA POSITIVIDADE DE HPV DE ACORDO COM HLA-DRB1.....	88

TABELA 19. RAZÕES DE CHANCES (OR) E INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (IC) PARA POSITIVIDADE DE HPV DE ACORDO OS HAPLÓTIPOS HLA-DRB1-DQB1.....	90
TABELA 20. RAZÕES DE CHANCES (OR) E INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (IC) PARA CCU DE ACORDO COM HLA-DQB1 E DRB1.....	92
TABELA 21. RAZÕES DE CHANCES (OR) E INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (IC) PARA CCU DE ACORDO COM HLA-DQB1 E DRB1.....	94
TABELA 22. RAZÕES DE CHANCES (OR) E INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (IC) PARA CCU POSITIVOS PARA VARIANTES AA DE ACORDO COM HLA-DRB1 E DQB1.	97
TABELA 23. RAZÕES DE CHANCES (OR) E INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (IC) PARA CCU POSITIVOS PARA VARIANTES B-2 (RAMO AA) DE ACORDO COM HLA-DRB1 E DQB1.	98
TABELA 24. RAZÕES DE CHANCES (OR) E INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (IC) PARA CCU POSITIVOS PARA VARIANTES DO RAMO E DE ACORDO COM HLA-DRB1 E DQB1.99	
TABELA 25. RAZÕES DE CHANCES (OR) E INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (IC) PARA CCU POSITIVOS PARA VARIANTES PROTÓTIPO (RAMO E) DE ACORDO COM HLA-DRB1 E DQB1.....	100
TABELA 26. RAZÕES DE CHANCES (OR) E INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (IC) PARA CCU POSITIVOS PARA VARIANTES B-12 (RAMO E) DE ACORDO COM HLA-DRB1 E DQB1.	101
TABELA 27. RAZÕES DE CHANCES (OR) E INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (IC) PARA CCU E6350G E E6350T POSITIVOS DE ACORDO COM HLA-DRB1.....	104
TABELA 28. RAZÕES DE CHANCES (OR) E INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (IC) PARA CCU E6350G POSITIVOS E E6350T POSITIVOS DE ACORDO COM HLA-DQB1.	105

ABREVIATURAS

AA:	asiático-americano
Af:	africano
APL:	peptídeos ligantes alterados
As + AI:	asiático-ameríndio
As:	asiático
CCU:	carcinoma do colo uterino
DNA:	ácido desoxirribonucleico
E:	europeu
EDTA:	ácido etilenodiaminotetracético
GRE:	<i>glucocorticoid responsive-element</i>
HLA:	antígenos leucocitários humano
HPV:	papilomavírus humano
HSIL:	lesão intraepitelial escamosa de alto grau
IC:	intervalo de confiança
IEC:	Instituto Evandro Chagas
ILPC-SP:	Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, filial de São Paulo.
INCA:	Instituto Nacional do Câncer
IOL:	Instituto Ofir Loiola
LCR:	longa região controladora
LSIL:	lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
MHC:	complexo principal de histocompatibilidade
mM:	milimolar
NIC	neoplasia intraepitelial cervical
nm:	nanômetro
OR:	Odds ratio; razões de chance
pb:	pares de bases
PCR:	reação em cadeia da polimerase
PV:	papilomavírus
RFLP:	polimorfismo de tamanho de fragmento
rpm:	rotação por minuto

SDS:	dodecilsulfato de sódio
SIL:	lesão intraepitelial escamosa
SSC:	solução salina citrato
SSPE:	solução salina fosfato-EDTA
TBE:	Tris-borato-EDTA
TE:	Tris EDTA
TEMED:	N, N, N', N'- Tetramethylethylenediamine

RESUMO

A infecção por papilomavirus é a principal causa de desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) e câncer do colo do útero (CCU). Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a persistência do genoma viral encontra-se associado a variantes moleculares específicas de papilomavirus humano (HPV) de alto risco. As moléculas HLA de classe II têm um importante papel na resposta imune. Associações entre HLA e CCU ou infecção por HPV tem sido demonstrado em diferentes populações. O nosso objetivo foi verificar se a variabilidade de HLA-DRB1 e DQB1 estavam associada ao CCU e NIC III em mulheres de Belém, uma população formada pelos 3 principais grupos étnicos humanos e uma área de alto risco para o CCU no Norte do Brasil. Foi investigada a existência de diferenças na distribuição de alelos HLA entre mulheres com CCU e NIC III portadoras de diferentes variantes de HPV-16 e mulheres citologicamente normais. Os genes HLA DQB1 e DRB1 foram tipados pelo método de PCR-SSO em 95 casos e 287 controles de mulheres com citologia normal atendidas em um centro de prevenção do colo do útero na mesma cidade. As variantes de HPV-16 foram tipadas por sequenciamento de um fragmento da região controladora do genoma viral (LCR). O polimorfismo na posição 350 do gene E6 foi tipado baseado em um protocolo de hibridização em pontos, para identificar a alteração na posição 350T→G. A magnitude das associações foi estimada por odds ratio (OR) e os respectivos intervalos de confiança (IC), ajustados para potenciais fatores de confusão. Uma associação positiva foi observada entre CCU e os haplótipos DRB1*1501-DQB1*0602, DRB1*04-DQB1*0301 e DRB1*1602-DQB1*0301. Ao contrário, DRB1*01-DQB1*0501 mostrou um efeito protetor. Os alelos DRB1*0804, DQB1*0402 apresentaram efeito protetor contra positividade por HPV. O alelo DQB1*0502 e o grupo DRB1*15 foram positivamente associados. Os nossos resultados mostram que as associações positivas de DRB1*1501 e DRB1*1602 podem ser atribuídas a variantes asiático-americanas quando comparado a variantes européias. O risco conferido a DRB1*1501 foi encontrado associado tanto a variantes E6350G quanto a variantes E6350T, entretanto, o maior efeito foi devido às variantes E6250T. A associação positiva de DRB1*1602 foi significativa somente no grupo de mulheres positivas para E6350G. Estes resultados estão de acordo com a composição étnica da população estudada bem como um maior potencial oncogênico de certas variantes. Nossos dados sugerem que a contribuição dos alelos HLA na susceptibilidade genética ao CCU difere de acordo com a distribuição das variantes de HPV em uma dada região geográfica ou grupo étnico.

ABSTRACT

Papillomavirus infection is the major cause for the development of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and invasive cervical cancer (ICC) in human. Epidemiological studies have demonstrated that persistence of the viral genome and development of cervical cancer are associated with specific molecular variants of high-risk human Papillomavirus (HPV). Human leukocyte antigen (HLA) molecules play a role in immune response and associations between HLA and ICC or HPV infections have been reported in several populations. We aimed to verify if HLA-DRB1 and DQB1 variability is related to ICC and CIN III in women from Belem, a population formed by the three main human ethnic groups and a high-risk area for this disease in Northern Brazil. We also investigated if there are differences in the HLA class II alleles distribution between women with ICC and CIN III that harbor different HPV-16 variants and women without cancer. HLA DRB1 and DQB1 were typed by PCR-SSO based methods in 95 ICC cases and 287 controls consisting of normal cytology from women attending cervical cancer screening programs in the same city. HPV-16 variants were typed by sequencing a PCR-amplified fragment of long control region (LCR) of the viral genome. The E6350 polymorphism was typed on the basis of a dot blot protocol targeting a specific nucleotide alteration in the position 350T→G of the E6 gene. The magnitude of associations was estimated by odds ratio (OR) and the respective 95% confidence interval (CI), adjusted for potential confounder factors. A positive association was found between ICC cases and DRB1*1501-DQB1*0602, DRB1*04-DQB1*0301 and DRB1*1602-DQB1*0301 haplotypes. Conversely, DRB1*01-DQB1*05 showed a protective effect. DRB1*0804, DQB1*0402 showed negative association against HPV infection. DQB1*0502 and DRB1*15 were positively associated with HPV infection. Our study showed that positive association of DRB1*1501 and DRB1*1602 alleles may be attributed to Asian-American then European variants. Furthermore, the DRB1*1501 was found associated with both women carrying E6350G or E350T, however, a higher effect was observed for E6350T variants carriers. The positive association of DRB1*1602 was significant for women harboring E6350G then E6350T variants. These data are in agreement with ethnical component of the studied population as well as a higher oncogenic potential of certain HPV variants. Our results also suggest that the contribution of HLA class II alleles to the genetic susceptibility to ICC differs depending on the HPV-16 variants distribution in a given geographic and ethnic group.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Câncer do colo do útero e o papilomavirus humano

1.1.1 Epidemiologia

Atualmente, o câncer do colo do útero (CCU) apresenta incidência mundial de 470.000 casos diagnosticados a cada ano (Ferlay *et al.*, 2004). Sendo observado no Brasil uma das maiores taxas de incidências desta doença (Fraumeni *et al.*, 1993).

Estima-se que o câncer do colo do útero seja o terceiro mais comum na população feminina, sendo superado apenas pelos cânceres de pele não melanoma e de mama. As estimativas do INCA apontam que 20.690 casos novos serão observados no Brasil no ano de 2005, com um risco estimado de 22 casos a cada 100 mil mulheres. A distribuição dos casos de CCU varia conforme a região analisada, o Norte do Brasil (sem considerar os tumores de pele não melanoma) apresenta as taxas de incidência mais elevadas desta doença, com 23% dos casos. Nas regiões Sul, Centro-Oeste, Sudeste e Nordeste representa o segundo tumor mais incidente (INCA, 2005).

Os papilomavírus humano (HPV) são freqüentemente encontrados na população em geral. Estudos caso-controle em vários países indicam a presença do DNA viral em mais de 90% dos cânceres do colo uterino (Bosch *et al.*, 1995). O HPV-16 ocorre em maior freqüência (50%), seguido pelo HPV-18 (12%), HPV 45 (8%) e HPV 31 (5%) (revisado em IARC *Working Group*, 1995; Muñoz, 1997). Têm sido verificadas pequenas oscilações na prevalência dos tipos de HPV nos diversos graus de lesões das diferentes populações estudadas. Esta variação reflete diferentes metodologias utilizadas nos estudos, prováveis erros de classificação na citologia oncológica ou diferenças no comportamento sexual (Bosch *et al.*, 1994; Castellsagué *et al.*, 1997).

A transmissão do HPV ocorre, principalmente, através de contato sexual seja ele vaginal, vulvar, peniano, cervical ou anal (revisado em IARC *Working Group*, 1995). Estudos transversais demonstram que variáveis como idade e comportamento sexual são os mais importantes determinantes da infecção cervical por HPV, o que confere um perfil de doença sexualmente transmissível (Franco, *et al.*, 1997). Bauer e col. (1991), observaram uma prevalência de 46% do DNA viral em 467 universitárias americanas sexualmente ativas. No entanto, a menor incidência de lesões neoplásicas do colo uterino sugere que grande parte das mulheres infectadas não desenvolve lesão. A maioria das infecções genitais é transiente, contudo, uma pequena proporção de mulheres com o DNA viral apresentam persistência da infecção por um mesmo tipo ou uma mesma variante molecular de um tipo de HPV. Este tipo de infecção está associado a maior risco de desenvolvimento de malignidade (Remmink *et al.*, 1995; Londesborough *et al.*, 1996; Villa *et al.*, 1997).

1.1.2 Organização Genômica dos Papilomavírus

Os Papilomavírus (PV) são pequenas partículas de aproximadamente 55nm, formadas por um capsídeo icosaédrico não envelopado composto por 72 capsômeros. Estes vírus são pertencentes à família *Papillomaviridae*, cujo genoma consiste de uma única molécula de DNA circular dupla fita, de aproximadamente 8.000pb complexado a proteínas semelhantes a histonas (Favre *et al.*, 1975; revisado por de Villiers *et al.*, 2004). O genoma dos PV encontra-se dividido funcionalmente em três segmentos: i) uma região não codificante denominada região controladora ou *Long Control Region* (LCR) que compõe aproximadamente 10% do genoma viral, nesta região são encontrados vários sítios de ligação para fatores de transcrição virais e celulares que participam na regulação da replicação e transcrição do genoma viral (revisado por Bernard, 2002); ii) a região precoce (*Early*) que contém de 6 a 8 genes que participam na replicação do DNA viral (E1, E2, E8) e no estímulo da proliferação celular (E5,

E6 e E7); iii) e a região tardia (*Late*) com 2 ORF que codificam as proteínas estruturais do capsídeo L1 e L2 (revisado por zur Hausen, 2000) (Figura 1).

Figura 1. Mapa físico do genoma do HPV-16. REGIÃO PRECOCE (EARLY), REGIÃO TARDIA (LATE), A LCR (LONG CONTROL REGION) CORRESPONDE A REGIÃO REGULATÓRIA (REVISADO POR VILLA, 1997).

1.1.3 Potencial Oncogênico dos HPV

Os HPV têm sido encontrados em vários tipos de lesões, desde displasias leves até o carcinoma invasivo do colo uterino (CCU), e carcinoma de pênis (revisado por zur Hausen, 1996). Tem sido evidenciada a distribuição preferencial de certos tipos de HPV em condilomas e neoplasias malignas (Lörincz, *et al.*, 1992). Os tipos mais associados ao câncer no colo do útero invasivo são classificados como de alto risco (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 66 e 68). Os tipos menos freqüentes em lesões malignas formam o grupo dos HPV de baixo risco (HPV 6, 11, 26, 40, 42, 53, 55, 57, 59).

Diferenças no potencial oncogênico entre HPV de baixo e alto risco têm sido verificadas por ensaios de transformação *in vitro* (Barbosa *et al.*, 1991). Foi observado que as proteínas E6 e E7 de HPV-16 e 18 transformam cultura de células primárias na presença de um oncogene ativado (Barbosa & Schlegel, 1989; Storey & Banks, 1993). Estas proteínas de tipos de HPV de alto risco também apresentam a habilidade de imortalizar queratinócitos primários de prepúcio ou o epitélio cervical humano (Sedman *et al.*, 1991). Os ensaios de transformação *in vitro* com culturas de queratinócitos também demonstram que a atividade transformante do HPV-18 é dez vezes maior que a apresentada pelo HPV-16 (Villa & Schlegel, 1991).

A proteína E7 de HPV-16 é composta por 98 aminoácidos e forma complexo com o produto do gene do retinoblastoma (pRB) (Dyson *et al.*, 1989), dessa forma, interferindo com a ligação de pRB a família de fatores de transcrição E2F. Em consequência, ocorre ativação da transcrição de genes celulares específicos da entrada na fase de síntese do ciclo celular tais como: DNA polimerase α , quinase dependente de ciclina-2 e timidina quinase. Estas são normalmente expressas em queratinócitos diferenciados. A proteína E7 também pode se

associar com os inibidores de quinase dependentes de ciclinas p21^{cp1} e p27^{kip1}, o que contribui para a estimulação da progressão do ciclo celular (revisado por Doorbar, 1998).

Simultaneamente, E6 de HPV de alto risco ligam-se e promovem a degradação do produto do gene supressor de tumor p53, através de sua associação com E6-AP, uma proteína com função de ubiquitina ligase (Werness *et al.*, 1990; Scheffner *et al.*, 1993). Assim, a associação entre E6 e E6-AP, promove a degradação de p53 pela via de proteólise dependente de ubiquitina (Scheffner *et al.*, 1990). Dessa forma, ocorre a perda do controle do ciclo celular antes exercido por p53. Este é um dos primeiros passos para a instabilidade cromossômica em células infectadas por HPV de alto risco (16 e 18) (revisado por Zur Hausen, 2002).

1.1.4 História Natural da Infecção por HPV

Os HPV possuem tropismo pelo tecido epitelial com especificidade para diferentes sítios anatômicos devido à ativação da replicação viral por fatores de transcrição epitélio-específicos (revisado por zur Hausen, 2002). A infecção das células por HPV pode ser dividida em estágios inicial e tardio, de acordo com o grau de diferenciação do epitélio celular. As lesões induzidas por PV são originadas pela infecção de queratinócitos na camada basal do epitélio em um estágio inicial da expressão dos genes precoces. Especula-se que o receptor para a entrada do vírus na célula seja a integrina $\alpha 6\beta 4$, a qual encontra-se confinada na camada basal (Evander *et al.*, 1997), entretanto, são necessários mais estudos para o esclarecimento desta questão. A infecção produtiva ocorre nos estágios tardios do ciclo de vida viral em queratinócitos diferenciados. Nessa fase é observada a produção e a montagem das partículas infecciosas pela expressão das proteínas codificadas pelos genes tardios L1 e L2 (revisado por zur Hausen, 2002).

O CCU parece ser proveniente de uma evolução contínua de lesões precursoras caracterizadas por atipias celulares, que ocorrem principalmente na área da junção escamo-

colunar (J.E.C.) da cérvix uterina. Estas lesões precursoras podem ser: displasia leve, moderada, severa e carcinoma *in situ* (CIS). Diversas classificações histopatológicas são utilizadas para os diferentes estágios destas alterações. Uma das nomenclaturas mais comuns é neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (Richart, 1990), que leva em consideração achados histológicos. De acordo com o grau de estadiamento, estas lesões podem ser divididas em três categorias: i) NIC grau I - as alterações acometem um terço do epitélio basal (displasia leve); ii) NIC grau II - apresenta comprometimento dos terços inferior e médio do epitélio (displasia moderada); iii) NIC grau III - todas as camadas epiteliais encontram-se alteradas, sendo equivalente ao CIS (displasia severa). Já a classificação de Bethesda (Luff, 1992), refere-se a diagnósticos citológicos e divide as lesões intraepiteliais escamosas (SIL) em: i) Baixo grau (LSIL) - condiloma plano e NIC I; ii) alto grau (HSIL) - inclui NIC II, NIC III e CIS; iii) carcinoma invasivo.

Nas LSIL e NIC I, o DNA viral encontra-se no estado episomal (não-integrado ao DNA celular), o que permite a síntese de proteínas tardias e a formação de partículas virais. Já nas HSIL e NIC II ou III, o DNA apresenta-se frequentemente integrado ao genoma da célula hospedeira, não havendo formação de partícula viral. O processo de integração ocorre mediante a quebra da molécula circular do DNA viral, na maioria das vezes, dentro da região onde se encontra o gene E2, responsável pelo controle da replicação e transcrição viral (Jeon & Lambert, 1995; Vernon *et al.*, 1997). Desta forma, ocorre a expressão aumentada dos transcritos gênicos de E6 e E7 e conseqüente estímulo da proliferação celular.

1.1.5 Diversidade Genômica dos PV

Os PV compõem um grupo de vírus heterogêneos e são encontrados em diversos *taxa*. Atualmente, tem sido identificado mais de 30 tipos de PV animal. Em humanos, são encontrados cerca de 120 tipos infectando vários sítios anatômicos, dos quais mais de 40 tipos estão associados a lesões anogenitais (revisado por de Villiers *et al.*, 2004).

A classificação taxonômica dos PV é baseada na identidade das seqüências nucleotídicas do gene L1. Para ser caracterizado um novo tipo de PV é necessário que haja diferenças nas seqüências nucleotídicas maiores que 10% quando comparado a tipos previamente descritos. Um subtipo é caracterizado quando as diferenças nas seqüências variam de 2 a 10%, e uma nova variante molecular de um tipo é definida quando as diferenças nestas seqüências nucleotídicas são menores que 2% (revisado por Bernard, 2005).

Os PV apresentam organização, tamanho genômico, ORF e função das proteínas similares. De todas as ORF, E1 e L1 são as mais conservadas entre os genes precoces e tardios, respectivamente (Bernard *et al.*, 1994). A diferença intratípica nessas regiões varia de 0 a 2,3%, e a diferença intertípica mais próxima varia entre 9,8 a 17,4%. Esta alta conservação do genoma dos HPV sugere uma origem monofilética para estes vírus (Chan *et al.*, 1992a; 1992b).

A análise das seqüências dos genes tais como E5, E6, E7, L1, L2 e da LCR em HPV-16 e 18 indicam que o polimorfismo intratípico é muito limitado. A variação intratípica observada nesses tipos de PV é menor que 2,5% dentro das ORF e até 5% na LCR (Chan *et al.*, 1992a; Ong *et al.*, 1993; Ho *et al.*, 1993).

1.1.6 Variantes Moleculares de HPV-16 e 18

Ho e col. (1991) iniciaram os estudos de variabilidade do HPV-16 analisando um segmento de 364pb da LCR viral. Foi observado que as seqüências nucleotídicas dos isolados de HPV-16 poderiam ser distinguidas devido a presença de 33 eventos de mutações representados por transições, transversões, inserções e deleções observadas nesta região do genoma. Em seguida, Chan e col. (1992a) examinaram o mesmo segmento do genoma viral em 118 espécimes provenientes do Brasil, Alemanha, Cingapura e Tanzânia. Nesse estudo, foram caracterizadas 38 variantes moleculares de HPV-16. Posteriormente, Ho e col. (1993) ampliaram esta amostra analisando 305 isolados oriundos de 25 regiões geográficas e/ou alguns grupos étnicos isolados na África, Eurásia, e nas Américas. Neste estudo foi identificado um total de 48 variantes moleculares de HPV-16 incluindo as variantes que haviam sido caracterizadas por Chan e col. (1992a).

Através da construção de uma árvore filogenética utilizando métodos de distância genética, verificou-se que o HPV-16 evoluiu ao longo de 5 ramos principais: dois predominantes na África (Af-1 e Af-2), um ramo asiático-americano (AA), um europeu (E) e um ramo asiático (As). A maior variabilidade foi encontrada nas amostras oriundas da África (Figura 2). Além disso, algumas variantes apresentavam combinações de mutações características de determinadas localizações geográficas (Ho *et al.*, 1993).

Figura 2. Árvore filogenética dos HPV-16 e HPV-18. Estas árvores foram construídas a partir da variabilidade nucleotídica de um fragmento da LCR de isolados de HPV-16 e 18 oriundos dos 5 continentes (extraído de Ho *et al.*, 1993 e Ong *et al.*, 1993).

Ong e col. (1993) estudaram a variabilidade de HPV-18 analisando um fragmento de 321pb da LCR. Neste trabalho foram identificadas 37 variantes moleculares que se agrupavam em 3 ramos na árvore filogenética: um ramo africano (Af), um europeu (E) e um ramo denominado asiático-ameríndio (As + AI) (ver Figura 2). Semelhante a HPV-16, a maior variabilidade foi encontrada nas amostras africanas. As variantes identificadas nas amostras brasileiras apresentaram mutações características dos ramos europeu e asiático-ameríndio. Em um dos espécimes de uma tribo indígena da Amazônia, foi identificada uma variante que diferia por uma mutação de ponto quando comparada a uma variante asiática encontrada no Japão (Ong *et al.*, 1993). Este fato sugere que a taxa de mutação do HPV seja muito baixa. A partir desse achado e considerando também outras evidências sobre a natureza e biologia destes vírus, foi utilizado um conceito de ‘relógio molecular’ no qual estimou-se que uma mutação nestes genomas levaria um período de 12.000 a 14.000 anos para se fixar em uma variante (Ong *et al.*, 1993). De modo interessante, esse é o tempo estimado para o povoamento do Novo Mundo por populações humanas ancestrais.

A diversidade das seqüências nucleotídicas em HPV-16 e 18 sugere origem monofilética e especiação na África num período estimado em 200.000 anos antes do presente, com subsequente diversificação a partir de duas grandes linhagens, uma africana e uma eurasiática. Estas originaram os 5 ramos principais da árvore de HPV-16, com posterior difusão destes vírus através de migrações das populações humanas ancestrais (Ho *et al.*, 1991; 1993; Ong *et al.*, 1993).

As Américas, ao contrário dos outros continentes, foram povoadas mais recentemente (entre 10.000 a 40.000 anos atrás) por populações humanas provenientes da Ásia através de rotas migratórias ocorridas na Beríngia antes da última glaciação (Bonatto & Salzano, 1997). As análises das amostras americanas sugerem que variantes dos ramos E e AA tenham sido transferidas para o Novo Mundo em um período de aproximadamente 12.000 anos (que

coincide com o estimado para o povoamento das Américas). Mais recentemente, essas duas linhagens teriam sido trazidas para a América do Sul junto com a migração de grupos da América do Norte.

Nestes estudos de variabilidade na LCR, grande parte das amostras foi proveniente de carcinoma e lesões de vários graus (80%) e, somente, 20% pertencem a amostras com citologia normal. Os genótipos de HPV-16 mais freqüentes em diferentes populações mundiais foram o protótipo (E), B-2 (AA) e a variante B-12 (E), sendo que esta foi a variante mais freqüente nos espécimes, independente do tipo de lesão. Diferenças na prevalência destes isolados foram observadas nas regiões geográficas: em Cingapura, o protótipo foi o genótipo mais freqüente tanto em amostras normais quanto em amostras de carcinoma; no Brasil, o protótipo e a variante B-2 foram encontradas em igual proporção; e na Alemanha, a variante B-12 foi a mais prevalente em carcinoma (Ho *et al.*, 1993). Tais divergências na distribuição geográfica das variantes podem ser, em parte, o reflexo de diferentes contribuições dos grupos étnicos nas regiões, ou provável diferença no potencial oncogênico das variantes.

Outros estudos a respeito da variabilidade de HPV têm sido realizados utilizando regiões codificadoras do genoma tais como E5, E6, E7, L1 (Icenogle *et al.*, 1991; Eschle *et al.*, 1992; Pushko *et al.*, 1994). Em 1995, Yamada e col. analisaram variações nos genes L1 e L2 e E6 e constataram que estas regiões são filogeneticamente compatíveis com os achados da LCR.

1.1.7 Variabilidade Intratípica do HPV-16 Associada ao Risco de Neoplasia Cervical

No início dos anos 90, foi levantada a hipótese das variantes apresentarem potencial oncogênico diferente. A variabilidade intratípica na LCR estaria associada a diferenças na capacidade de ligação de fatores celulares e virais que atuam na regulação da replicação e

transcrição viral, resultando em maior ou menor atividade transcricional. Já a variabilidade nos genes que codificam proteínas, como E6 e E7, estaria associada a um maior potencial de imortalização e transformação celular.

Ho e col. (1991) através de ensaios de transcrição *in vitro*, utilizando o gene repórter clorafenicol acetiltransferase (CAT), não observaram diferenças significativas entre a LCR das variantes na capacidade de ativar a transcrição, concluindo não haver associação entre variação genômica e variação no potencial carcinogênico. Entretanto, diferentes propriedades biológicas e bioquímicas foram encontradas nas variantes moleculares de HPV (Stöppler *et al.*, 1996; Sherman *et al.*, 1997). Foi verificado que variantes do ramo AA apresentam maior capacidade de degradar p53 e alterar a diferenciação de queratinócitos (Stöppler *et al.*, 1996). Ainda mais, variantes do gene E6 (ramo Af-2), que diferem entre si por substituições de aminoácidos na extremidade amino-terminal da proteína, apresentam maior capacidade de transativação ou inibição de p53, quando comparadas com o protótipo (Sherman *et al.*, 1997). Veress e col. (1999) através de ensaios de transcrição *in vitro*, usando o gene repórter da luciferase de vagalume, verificaram que as variantes do ramo europeu possuíam atividade de transcrição semelhante ao controle (protótipo). No entanto, a variante asiático-americana B-2 apresentou atividade transcricional 1,7 vezes maior em relação ao protótipo. Nesse mesmo trabalho, foi realizado o mapeamento da região responsável pela maior atividade de transcrição desta variante, onde foi constatado que as alterações entre os nucleotídeos 7660-7890 eram responsáveis pelo aumento da transcrição (Veress *et al.*, 1999). Outro estudo também identificou maior atividade transcricional da variante asiático-americana B-2 (Kozuka *et al.*, 2000). Mais recentemente, Sichero e col. (2005) observaram uma significativa variação na atividade transcricional das variantes de HPV-18, com diferenças de 2,64 a 5,91 (variantes do ramo E) e de 5,16 a 8,18 (variantes do ramo AS-AI) vezes mais atividade quando comparadas à variante usada com referência (B-18-2 do ramo E).

Os dados epidemiológicos têm sido importantes para o entendimento da história natural da infecção dos HPV e o papel das variantes moleculares nas neoplasias cervicais (Villa *et al.*, 1997). Estudos longitudinais demonstram que algumas variantes de HPV-16 e 18 tendem a persistir, o que poderia significar uma vantagem funcional importante na progressão da doença (Xi *et al.*, 1995; Londesborough *et al.*, 1996; Lizano *et al.*, 1997a; Villa *et al.*, 2000). Análises genotípicas de isolados de HPV-16 têm verificado associação entre uma variante do gene E6 e a infecção persistente, o que levaria ao desenvolvimento de HSIL (Londesborough *et al.*, 1996). Esta variante apresenta uma substituição no nucleotídeo 350T→G que resulta na mudança do aminoácido 83 de leucina para valina. Tem sido sugerido que este polimorfismo encontra-se associado a malignidade, podendo variar de acordo com a população estudada. Zehbe e col. (1998a) verificaram alta prevalência da substituição 350G em mulheres suecas com CCU. Entretanto, Nindl e col. (1999b) encontraram distribuição uniforme desta substituição em lesões pré-invasoras e invasoras de mulheres da Alemanha. Ainda mais, este polimorfismo foi considerado um fator de baixo risco em mulheres italianas e holandesas (Bontkes *et al.*, 1998; Zehbe *et al.*, 1998b). Deste modo, sugere-se que diferenças genéticas entre as populações sejam um fator adjuvante do potencial oncogênico das variantes.

Os estudos de prevalência que analisaram amostras provenientes de diversos graus de lesões verificaram que a variante européia de HPV-16 denominada B-12 é a mais freqüente no mundo (Ho *et al.*, 1993). Também foi observado que em povos indígenas da América do Sul (Mundurucu, Tiriyo e Waiãpi na Amazônia e ameríndios do Chaco na Argentina), as variantes européias encontram-se em 83% das amostras (Ho *et al.*, 1993). Os isolados deste ramo filogenético também prevaleceram em lesões de alto grau e carcinoma oriundas de índias quechuas da província argentina de Jujuy (93%) (Picconi *et al.*, 1999). Yamada e col. (1997) verificaram que as variantes africanas constituíam 92% dos espécimes provenientes da África e somente 9% destas foram detectadas em outras regiões geográficas. As variantes do ramo E

foram encontradas na maioria dos espécimes de todas as regiões (com exceção das amostras africanas), variando de 60% no sudeste da Ásia a 93% na América do Norte. As variantes asiáticas constituíram 26% dos espécimes do sudeste asiático, estas foram raras ou ausentes nos outros continentes. As variantes do ramo AA foram encontradas nas Américas Central e do Sul (20% dos espécimes) e na Europa (14% dos espécimes) (Yamada *et al.*, 1997). Na cidade de São Paulo, tem sido verificado o predomínio de variantes européias (66,7%) em espécimes cervicais oriundos de LSIL, entretanto, deve-se considerar também a presença da variante asiático-americana B-2 em 29% dos casos (Villa *et al.*, 2000). Em amostras de CCU, provenientes da população de Belém (PA), as variantes européias foram encontradas em 42% das amostras. Foi observado também um predomínio da variante do ramo AA em relação aos isolados do ramo E (Junes, 2000). Resultados similares foram obtidos na cidade de João Pessoa (PB) (Souza, 2001), e no Distrito Federal (Cruz *et al.*, 2004). As diferenças na prevalência das variantes em diversos estudos podem ser devido à origem das populações estudadas ou ao tipo de lesão analisada.

1.2 O Sistema HLA

As moléculas HLA são importantes no desenvolvimento e controle da resposta imune, uma vez que estas estão envolvidas na apresentação de peptídeos antigênicos às células T. Os genes HLA apresentam um alto grau de polimorfismo e estão localizados na região denominada Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) na posição 6p21.3 do genoma humano (revisado por Moss & Khana, 1999).

O MHC humano foi dividido em três regiões denominadas de classe I, II e III. Na região de classe I estão os genes que codificam moléculas expressas na superfície da maioria das células nucleadas (HLA-A, B, C, E, H, G e F). Sua função mais conhecida é a

apresentação de peptídeos antigênicos aos linfócitos T CD8⁺ (citotóxicos) e regular a ação de células NK (*natural killer*) (Dembic *et al.*, 1986). Na região de classe II estão os genes HLA-DR, DQ e DP que codificam moléculas expressas em células apresentadoras de antígenos, como linfócitos B, células dendríticas (células de Langerhans) e macrófagos. Estas moléculas apresentam peptídeos antigênicos aos linfócitos T CD4⁺ (auxiliares). Na região de classe III estão os genes que codificam as proteínas do sistema complemento e o fator de necrose tumoral (TNF) (revisado por Moss & Khana, 1999).

As moléculas de classe I e II são estruturalmente semelhantes, sendo constituídas por uma cadeia polipeptídica α e uma β . Com a diferença de que nas moléculas de classe I, a cadeia α é codificada pelos genes de classe I (HLA-A, -B, ou -C) e a cadeia β pelo gene da β_2 -microglobulina (localizado no cromossomo 15, não pertencente ao MHC). Já as cadeias α e β das moléculas de classe II são codificadas exclusivamente por genes HLA de classe II (Figura 3). Como exemplo, a molécula HLA-DR é codificada pelos genes HLA-DRA1 (cadeia α) e HLA-DRB1 (cadeia β).

As moléculas de classe I e II estruturalmente formam uma fenda na porção superior das moléculas, originando o sítio de ligação do peptídeo antigênico a ser apresentado aos linfócitos T (Bjorkman *et al.*, 1987, Brown *et al.*, 1993). É nesta região da fenda que está localizado o sítio polimórfico das moléculas HLA. Estes sítios também são denominados *pockets* e sua composição varia conforme o alelo que codifica a molécula, o que gera uma grande diversidade de seleção e apresentação de antígenos entre indivíduos.

Figura 3. Representação esquemática das moléculas HLA de classe I e II. Na molécula HLA 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 cadeia de HLA classe I 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.

1.2.1 Associação entre Genótipos de HLA e a Infecção por HPV

Evidências epidemiológicas apontam o HPV como o principal agente responsável pelo desenvolvimento do câncer cervical. No entanto, somente uma minoria de infecção persistente por estes vírus progride para o câncer, indicando o envolvimento de outros fatores ou cofatores que aumentam o risco de progressão para a malignidade. A resposta imune juntamente com genótipos HLA do indivíduo pode influenciar na ocorrência de lesões associadas ao HPV. Uma maior susceptibilidade à infecção pelo HPV tem sido atribuída a alguns polimorfismos de genes HLA (Apple *et al.*, 1994; revisado por Maciag & Villa, 1999). Estudos realizados em diversas populações têm verificado diferentes e controversos resultados de associação entre polimorfismos do MHC e susceptibilidade ao câncer cervical (Apple *et al.*, 1995; Hildesheim *et al.*, 1998; Cuzick *et al.*, 2000). Dados relativos à população brasileira demonstram associação do haplótipo DRB1*15-DQB1*0602 e entre as pacientes com CCU HPV positivas (Maciag *et al.*, 2000). Estes genótipos poderiam aumentar as chances de estabelecimento de infecção persistente de HPV, elevando o risco de desenvolvimento de lesões cervicais malignas. Com o objetivo de esclarecer esta questão, polimorfismos de genes HLA classe II vêm sendo investigados em um estudo prospectivo realizado na cidade de São Paulo (Franco *et al.*, 1999; Maciag *et al.*, 2002).

Estudos sugerem que a resposta imune celular é a mais importante no controle da infecção por HPV. Assim, interações apropriadas entre moléculas MHC e peptídeos antigênicos possuem um papel crucial na ativação de células T. Estas moléculas são codificadas por diferentes genes e alelos e apresentam distintas propriedades de ligação ao antígeno. Logo, a variabilidade observada no MHC do hospedeiro torna-se importante na definição de uma resposta imune eficiente contra um patógeno ou células tumorais. Da mesma forma, epitopos virais também podem afetar as propriedades de reconhecimento antigênico do

sistema imune. Foi observado em uma grande proporção de pacientes HLA-B7 positivas uma variante de HPV-16 que apresenta uma mutação de ponto na proteína E6 (G131). Esta substituição, que altera a ligação do epítipo à molécula HLA-B7, poderia influenciar no reconhecimento apropriado por linfócitos específicos, uma vez que a ativação de células T depende da apresentação de peptídeos antigênicos em moléculas HLA presentes nas células apresentadoras de antígenos (Ellis *et al.*, 1995). Assim, a diversidade das variantes em regiões codificadoras do genoma viral, juntamente com alelos HLA, poderiam influenciar a formação da resposta imune. Diferentes epítopos do HPV podem ser imunogênicos em alguns indivíduos mas em outros não. Parte deste resultado pode ser atribuído ao HLA do indivíduo, entretanto, deve-se considerar também a variabilidade do HPV (Maciag & Villa, 1999). O conhecimento destas interações é importante para o esclarecimento do papel das moléculas HLA na resposta imune contra infecções por HPV e o câncer cervical.

1.3 Polimorfismos de DNA e Estudos Populacionais

1.3.1 Polimorfismos de DNA Nuclear

Os polimorfismos de DNA são caracterizados pela presença de múltiplos alelos em um *locus*, onde mais de um alelo apresenta frequência relativa igual ou superior a 1% (Bodmer & Cavalli-Sforza, 1976). Os principais tipos de marcadores observados no DNA genômico são: Polimorfismo de um Único Nucleotídeo (SNP), Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP), Número Variável de Repetição em Tandem (VNTR).

Os SNP são polimorfismos caracterizados pela substituição, perda ou adição de um único nucleotídeo. Esses polimorfismos são a classe de variantes mais comuns do genoma humano. Os RFLP foram a primeira geração de marcadores de DNA, os quais são caracterizados pela presença de apenas dois alelos (sítio presente ou ausente) o que limita as

informações desta técnica para o uso em genética de populações e estudo de mapeamento, pois poucos indivíduos são informativos e a heterozigosidade para o *locus* em questão é no máximo de 50% (Parsons & Holland, 1998). Os VNTR são unidades de repetição *in tandem* cujas seqüências cernas são encontradas repetidas em diferentes números de vezes. De acordo com o tamanho das unidades de repetições, os VNTR são classificados em 3 grupos: microssatélites (1-2 pb), *Short Tandem Repeats* (STR, 3-6pb) e minissatélites (>10pb) (Shriver *et al.*, 1995). Em populações humanas as análises de polimorfismo genético são empregadas para inferir acerca da contribuição genética e do caminho percorrido pelas populações ancestrais até a formação das populações atuais. Para tanto, as STR têm sido extensivamente utilizadas pois apresentam elevado número de alelos, alta heterozigose e encontram-se em regiões não codificantes de DNA; as quais são menos afetadas pela seleção natural. Estas características tornam estes polimorfismos altamente informativos para os estudos de estrutura genética de populações (Harding, 1992; Armour *et al.*, 1996; Cerdas-Flores *et al.*, 2002).

1.3.2 Polimorfismos do DNA mitocondrial (mtDNA)

O mtDNA é uma pequena molécula circular, dupla fita de 16.569 pb, localizado na mitocôndria. Este apresenta aproximadamente 90% de seqüências codificadoras, as quais consistem de 2 genes de rRNA, 22 genes de tRNA para a síntese das proteínas mitocondriais e 13 genes estruturais de proteínas essenciais à respiração mitocondrial (Anderson *et al.*, 1981). A molécula do mtDNA apresenta uma região não codificante entre os genes tRNA^{Phc} e tRNA^{Pro} denominada de alça-D, onde inicia-se a replicação do mtDNA.

O genoma mitocondrial apresenta algumas características ímpares que o torna excelente ferramenta para o estudo de genética de populações e evolução humana: i) o mtDNA tem herança exclusivamente materna (Giles *et al.*, 1980); ii) é haplóide e não sofre recombinação em humanos (Ingman *et al.*, 2000), logo as diferenças acumuladas entre duas

moléculas qualquer refletem variações que ocorreram desde que elas compartilharam um ancestral comum; iii) o mtDNA possui taxa de mutação 10 vezes maior do que se observa no DNA nuclear (Horai *et al.*, 1995). A taxa de mutação na alça-D também é dez vezes maior do que a observada no resto do genoma mitocondrial, tornando essa região o alvo preferencial dos estudos por sequenciamento que visam quantificar a variabilidade genética intra e interpopulação humana (Horai & Hayasaka, 1990; Horai *et al.*, 1993).

A análise da variação do mtDNA por RFLP na população global permitiu identificar um número de clados monofiléticos nos quais todos os mtDNA puderam ser classificados. Esses clados ou haplogrupos foram distinguidos por mutações ancestrais que ocorreram há milhares de anos. Isto permitiu identificar variações continente-específicas para africanos, europeus caucasianos (Torroni *et al.*, 1994) e asiáticos (Schurr *et al.*, 1990).

Quase todos os mtDNA de origem africana podem ser classificados em um dos 3 principais haplogrupos (L1, L2, L3). O haplogrupo L1 é considerado ancestral, uma vez que foi encontrado na raiz da árvore filogenética humana do mtDNA. Acredita-se que os super haplogrupos eurásianos M e N deixaram África a aproximadamente 50.000-60.000 anos para dar origem aos haplogrupos da Ásia (A,B,C,D,F) e Europa (H, I, J, K, T, U, V, W, X).

1.3.3 Diferenciação Étnica de Populações

Para estimar a contribuição étnica em uma população um marcador genético é considerado ideal quando este apresenta elevada frequência alélica diferencial (δ) entre as populações. Estes alelos são chamados “alelos população-específicos” (PSA) os quais apresentam elevados valores de δ (>50%) (Dean *et al.*, 1994; Shriver *et al.*, 1997). Chakraborty e col. (1991) sugerem que a precisão das estimativas de mistura interétnica é diretamente dependente do nível de diferenças nas frequências alélicas (δ) entre as populações

parentais. Assim, em estudos de mistura interétnica a representatividade das populações parentais e de suas frequências alélicas são fundamentais para a obtenção de estimativas mais precisas dos coeficientes de mistura.

Vários grupos populacionais têm sido investigados em relação a diversos *loci* de STR. Os resultados destes trabalhos revelaram que o número de alelos dos diferentes *loci* é muito semelhante entre as populações. Contudo, algumas populações apresentam diferenças significativas em suas frequências alélicas, sugerindo que estes sistemas podem ser utilizados para identificar diferentes grupos étnicos (Chakraborty *et al.*, 1992; Dekker *et al.*, 1992).

Com objetivo de melhor explorar a informação molecular provenientes dos VNTR, alguns modelos estatísticos, que se baseiam no processo mutacional destes marcadores, têm sido propostos. A estatística F_{ST} está relacionada ao modelo de mutação dos alelos infinitos (*Infinite Allele Model*, IAM), onde cada mutação produz um novo alelo de qualquer tamanho, resultando em um número infinito de alelos (Kimura & Ohta, 1964). A estatística R_{ST} (Slatkin, 1995) é análoga a F_{ST} e está relacionada ao modelo de mutação gradativa (*Stepwise Mutation Model*, SMM), o qual assume que cada alelo pode mutar em uma unidade de repetição tanto para mais quanto para menos, podendo levar a formação de um alelo já existente (Kimura & Ohta, 1978). Foi observado por Shriver e col. (1993) que as três classes de VNTR estão sujeitas a diferentes forças de mutação, com os *loci* de STR seguindo o modelo SMM e os *loci* de microsatélites e minissatélites desviando-se para o modelo IAM.

Os registros históricos também mostram evidências do processo de mistura e os modelos sugeridos de formação da população podem ser investigados pela análise genética e, então, confrontados com o que se conhece sobre a estrutura demográfica, social e histórica da população miscigenada.

A variabilidade em VNTR é frequentemente utilizada em estudos de genética de populações, uma vez que estes marcadores têm indicado boa diferenciação entre as populações

estudadas (Deka *et al.*, 1992; Nolelli *et al.*, 1992; Bortolini *et al.*, 1995; Robinson *et al.*, 1996; Zago *et al.*, 1996; Hutz *et al.*, 1997; Katsuyama *et al.*, 1998; Vallinoto *et al.*, 1998; Rodrigues, 1999; Silva *et al.*, 1999).

Zago e col. (1996) estudaram 6 VNTR (incluindo D1S80, D4S43, APO3'-B, VW) entre populações ameríndias e compararam com três outras populações brasileiras incluindo brancos, negros e japoneses. Os dados obtidos permitiram uma clara distinção entre as quatro populações analisadas, uma vez que foram observadas diferenças no padrão de distribuição alélica, além da presença ou ausência de alelos específicos de determinada população. Silva e col. (1999) aplicaram os mesmos marcadores para estimar diferenças genéticas entre populações afro-brasileiras, populações afro-venezuelanas e africanas, resultando em um elevado grau de diferenciação entre as cinco populações estudadas.

Adicionalmente, os estudos do genoma mitocondrial humano têm sido amplamente utilizados para traçar a origem e os padrões de migração do homem moderno. Estes trabalhos têm sido realizados principalmente pela análise de RFLP (Wallace *et al.*, 1985; Torroni *et al.*, 1993), deleção de 9 pb (Hertzberg *et al.*, 1989) e substituições nucleotídicas que ocorrem na alça -D (Horai & Hayasaka, 1990; Stoneking, 1993).

A análise do mtDNA é bastante útil uma vez que a abordagem utilizando polimorfismos de DNA nuclear não permite detectar diferenças no grau de contribuição masculina e feminina de cada etnia (fluxo gênico assimétrico) no processo de miscigenação. Quando uma população é formada pela mistura de genes de duas ou mais populações, homens e mulheres de cada uma das populações parentais podem não contribuir com a mesma proporção de genes para o conjunto gênico da população miscigenada (Batista-dos-Santos *et al.*, 1999; Ribeiro-dos-Santos *et al.*, 2002). Entretanto, deve-se considerar que a contribuição de uma determinada etnia pode ser dramaticamente reduzida quando se analisa o mtDNA e o DNA do cromossomo Y, uma vez que esta é uma herança uniparental.

1.4 Objetivos

Estudos longitudinais demonstram que algumas variantes moleculares do HPV-16 encontram-se mais associadas ao desenvolvimento de HSIL. As diferenças na prevalência das variantes de HPV-16 observadas em diversos estudos poderiam ser atribuídas a uma contribuição diferencial de grupos étnicos em diferentes regiões. O polimorfismo de genes HLA parece contribuir na suscetibilidade ao desenvolvimento de lesões malignas relacionadas ao HPV. Assim, este projeto visa identificar possíveis associações entre alelos e haplótipos dos genes HLA-DRB1 e DQB1 com o desenvolvimento de câncer no colo do útero na região Norte do Brasil.

Os objetivos específicos referentes a este projeto são:

1. Determinar a prevalência das variantes de HPV-16 na população de mulheres citologicamente normais da cidade de Belém (PA) em relação à prevalência de variantes em mulheres com câncer do colo do útero.
2. Definir a correlação entre grupo étnico e distribuição de variantes de HPV-16 nesta população.
3. Estudar a associação entre alelos e haplótipos dos genes HLA-DQB1 e HLA- DRB1 e a infecção por variantes de HPV-16.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras Clínicas

Foram utilizadas amostras provenientes de um estudo desenvolvido no Instituto Evandro Chagas (IEC, Belém-PA), em colaboração com o Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer de São Paulo (ILPC-SP). Os espécimes consistiram de biópsias oriundas da cérvix uterina de mulheres com idade entre 18 e 81 anos, com diagnóstico histopatológico de neoplasia intraepitelial cervical de grau III (NIC III) e carcinoma epidermóide invasor do colo do útero (CCU). A coleta das amostras foi realizada de forma sequencial no período entre 1992 e 1996 no centro de referência para o câncer na região Norte, Instituto Ofir Loila (IOL) (Noronha *et al.*, 1999).

Todas as amostras HPV-16 e 18 do estudo acima mencionado, foram previamente selecionadas para a análise de variantes moleculares (Junes, 2000), sendo 81 espécimes HPV-16 positivos e 14 HPV-18 positivos. Desta forma, um total de 95 biópsias do colo do útero foram analisadas no presente estudo, sendo 21 com diagnóstico histológico de NIC III e 74 casos de CCU.

Este estudo também inclui amostra aleatória de mulheres oriundas de um projeto apoiado pelo programa de apoio ao desenvolvimento científico e tecnológico (PADCT) realizado em Belém-PA. A coleta foi iniciada em setembro de 2000 a janeiro de 2003, cerca de 1000 esfregaços cervicais foram coletados. Deste estudo, foram selecionadas 302 amostras para a realização das tipagens dos genes HLA de classe II DRB1 e DQB1. Estes espécimes compõem o grupo controle e estão divididos do seguinte modo:

102 esfregaços cervicais de mulheres positivas para o DNA de HPV (incluindo esfregaços com diagnóstico de atipia de células escamosas de significado indeterminado, ASCUS), porém sem lesões neoplásicas.

200 esfregaços de mulheres com citologia normal do colo uterino, negativos para a presença do DNA de HPV.

2.1.2 Coleta das Amostras

Dos espécimes coletados do colo do útero através de biópsias, um fragmento foi fixado em formol tamponado e encaminhado ao Serviço de Patologia do Instituto Ofir Loiola para a realização do diagnóstico histopatológico. Um outro fragmento foi armazenado em nitrogênio líquido para o posterior isolamento do DNA utilizando o *kit* Glass Max DNA *Isolation Spin Cartridge Sistem*, GIBCO/BRL, MD, USA. Esta etapa foi realizada pelo laboratório do Dr. Wyller Mello (IEC).

Posteriormente, o DNA isolado foi encaminhado ao ILPC-SP onde foi realizado o teste de HPV utilizando a técnica de PCR segundo Manos e col. (1989). Em seguida foi realizada a tipagem de HPV pela técnica de hibridização em pontos (*dot-blot*) ou *line blot* ou RFLP (Ting & Manos, 1990; Bauer *et al.*, 1993).

2.2 Clonagem e Sequenciamento da LCR Viral

A análise da variabilidade intratípica do HPV-16 em amostras de CCU da população de Belém foi realizada previamente (Junes, 2000). Para a caracterização das variantes moleculares, 81 espécimes positivos para HPV-16 foram selecionados para a amplificação de um fragmento da LCR conforme Ho e col. (1991). Esta é uma região hipervariável do genoma

viral que permite a observação de maior diversidade entre as variantes de um tipo de HPV quando comparada com regiões codificadoras. A técnica consistiu na amplificação de um fragmento de 364pb da LCR próximo à origem de replicação viral, com posterior clonagem e seqüenciamento do produto de PCR para a caracterização ao nível de variantes moleculares. As seqüências de cinco clones de cada amostra foram analisadas através de comparação com seqüências depositadas no banco de dados *Genebank* e publicação em revista científica (Ho *et al.*, 1993).

2.3 Análise de Variantes do gene E6 de HPV-16 por Hibridização em Pontos

As amostras HPV-16 positivas também foram submetidas a uma amplificação de um fragmento do gene E6, para posterior hibridização com sondas complementares a este gene (Wheeler *et al.*, 1997). Das 81 amostras positivas para HPV-16 que tiveram um fragmento da LCR seqüenciado, 76 também foram tipadas por hibridização utilizando 2 sondas de oligonucleotídeos complementares à posição do nucleotídeo 350 do gene E6: 350T (5'TTGTTATAGTTTGTATGGAA3') e 350G (5'TTGTTATAGTGTGTATGGAA3') (Yamada *et al.*, 1995), (Junes, 2000).

Inicialmente 60µl da reação de PCR foram desnaturados por 10 minutos com 1ml de solução de desnaturação (NaOH 0,4 M, EDTA 25 M). A membrana Hybond-N+ (Amersham, UK) foi ajustada a uma *dot machine*. Sempre com o vácuo ligado, foram pipetados sobre a membrana 50µl da solução de desnaturação acrescida do DNA amplificado. Após a aspiração completa da amostra desnaturada, cada poço foi lavado com 400µl de 20x SSPE (NaCl 3,6M, NaH₂PO₄-H₂O 0,2M, NaOH 0.11M, EDTA 0,02M ajustado para pH=7,4). Em seguida, a membrana foi exposta à luz ultravioleta, por 10 minutos, para a fixação dos DNA. As membranas contendo os amplicons correspondentes ao gene E6 foram submetidas à

hibridização utilizando 2 sondas separadamente. Foi realizada uma pré-hibridização incubando as membranas, sob agitação, a 65°C com 200ml de 0,1x SSPE contendo 0,5% de SSC, por 10 minutos. As hibridizações com as sondas biotinizadas (2,0pmol de sonda para cada 50ml de solução de hibridização) foram conduzidas por 3 horas em 5x SSPE contendo SDS 0,1%, em um forno de hibridização (*Hybaid*, UK), utilizando-se garrafas para hibridização de 200ml. Em cada garrafa foi hibridizada apenas uma membrana. As hibridizações com as sondas complementares ao gene E6 foram conduzidas a 42,5°C. Em seguida à hibridização, foram feitas as lavagens para retirada da sonda ligada inespecificamente. Cada garrafa foi enxaguada com 125ml de solução de lavagem, 2x SSPE contendo SDS 0,1%, à temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram lavadas com 2x SSPE com agitação, durante 10 minutos por 2 vezes, com troca de solução entre as lavagens. As membranas hibridizadas com a sonda 350G foram lavadas a 44°C, já as membranas hibridizadas com a sonda 350T foram lavadas a 47°C. Ao final foi realizada uma lavagem a temperatura ambiente, por 10 minutos, com a mesma solução. Cada 2 membranas foram incubadas em 100ml de 2x SSPE, 0,1% SDS, e 600µl do conjugado estreptavidina-HRP (1mg/ml; *Vector Laboratories, CA, USA*) a uma concentração final de 30 ng/ml durante 20 minutos a temperatura ambiente, sob agitação. Após a incubação, as membranas foram enxaguadas em 500ml de 2x SSPE, 0,1% SDS, seguido de duas lavagens de 10 minutos, sob agitação vigorosa a temperatura ambiente em 500ml de 2x SSPE, 0,1% SDS, com troca de solução entre as lavagens. Para a revelação foi utilizado um sistema de detecção direta de ácidos nucleicos (ECLTM *Amersham Life Science*, UK). Logo após um filme de raio-X (X-OMATTM KODAK) era exposto às membranas por 5-10 minutos, sendo depois expostas à outro filme por 1 hora. Após cada um desses períodos, os filmes foram mergulhados em revelador por 45 segundos, seguido de uma imersão rápida em água, e em solução fixadora por 2 minutos. Seguiu-se uma lavagem por 5 minutos em água, e posterior secagem dos filmes. .

2.4 Polimorfismos de DNA Utilizados na Determinação da Origem Étnica da População de Belém

2.4.1 Tipagem dos Segmentos do mtDNA

Todas as amostras (esfregaços cervicais citologicamente normais e de CCU e NIC III) foram submetidas à análise dos segmentos de mtDNA pela amplificação dos fragmentos de DNA através da técnica de PCR. O produto amplificado das regiões do mtDNA (663 *Hae*III, 3.592 *Hpa*I, 5.176 *Alu*I, 13.259 *Hinc*II, 7.025 *Alu*I, 12.308 *Hinf*I, 13.366 *Bam*HI, 13.704, *Bst*NI e deleção de 9 pb) também foi submetido à análise de tamanho de fragmento (RFLP) utilizando as enzimas de restrição correspondentes (exceto a deleção de 9 pb). Desta forma foi realizada a análise das mutações que definem os haplogrupos mitocondriais previamente definidos por Torroni *et al.* (1993).

A visualização foi realizada por meio de eletroforese vertical, modelo V16-2 (BRL, Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD, USA), utilizado PAGE a 8%, BTE 1x (Tris-borato 89 mM e EDTA, pH 8,3 2 mM), 150V constantes por cerca de 3 horas e coloração com nitrato de prata com algumas modificações do protocolo descrito por Sanguinetti *et al.*, (1994). Os marcadores de peso molecular ϕ X174/*Hae*III e 100 pb (GIBCO-BRL) foram aplicados em cada gel.

2.4.2 Amplificação das STR

Para a tipagem das STR foi utilizado o *kit* comercial AmpFLSTR PlusTM PCR Amplification Kit (Applied Biosystems). Este *Kit* é recomendado pelo TWGDAM (*Technical Working Group on DNA Analysis Methods*), e é baseado na detecção do tamanho dos fragmentos por fluorescência, permitindo a amplificação de 9 *loci* de STR (D3S1358, D5S818,

D7S820, D8S1179, D13S317, D18S51, D21S11, FGA e VWA), além do *locus* da amelogenina. Como controles interno foi utilizado o padrão de tamanho Gene-Scan-500 ROX. A eletroforese dos produtos de PCR ocorreu em um ABI Prism[®] 3100 DNA Sequencer (Foster City, CA). Os dados foram coletados pelo ABIPRISM[®] 3100 Collection Software (Perkin, Elmer) e analisados através do GeneScan[®] Analysis 2.1. A genotipagem automática dos alelos foi realizada utilizando o Genotyper[®] Software 3.1.

2.5 Tipagem dos Genes HLA

A tipagem dos genes HLA-DQB1 e HLA-DRB1 foi realizada utilizando a técnica de PCR-SSO. Os iniciadores utilizados para a amplificação do segundo exon destes genes, assim como as sondas específicas utilizadas na hibridização são recomendadas pelo 12^o Workshop Internacional de Histocompatibilidade (12^o IHWC) (Bignon & Fernandez-Viña, 1994).

2.5.1 Amplificação do Gene HLA-DQB1

Para o preparo da reação de amplificação do segundo exon do gene HLA-DQB1 (volume final de 30µl), foram utilizados os seguintes componentes e respectivas concentrações: 1x tampão *Taq* (KCl 50mM, Tris-HCl 10mM, pH 8,3, MgCl₂ 1,5mM), 0,2mM de cada dNTP, 0,4µM de cada iniciador (Tabela 1), 0,05U/µl de *Taq* Gold (Applied Biosystems) e 2,5µl de DNA. As ciclagens foram efetuadas da seguinte forma: 1 ciclo inicial de desnaturação do DNA a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e 10 minutos de extensão final a 72°C. Os iniciadores utilizados na amplificação do gene HLA-DQB1 foram: 2DQBAMP-A 5'CATGTGCTACTTCACCAACGG3' e 2DQBAMP-B 5'CTGGTAGTTGTGTCTGCACAC (Bignon & Fernandez-Viña. 1994).

2.5.2 Amplificação do gene HLA-DRB1

Devido à complexa organização genômica e ao elevado número de alelos no *locus* DRB1, a tipagem deste gene é realizada em duas etapas. Inicialmente, faz-se uma reação de PCR utilizando iniciadores genéricos que amplificam o segundo exon dos genes HLA-DRB (incluindo DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 além de pseudogenes como DRB6). O produto genérico é submetido à hibridização com sondas específicas que permitem a classificação em 7 grupos alélicos:

- DR1 – inclui os alelos DRB1*01;
- DR2 – inclui os alelos DRB1*15 e DRB1*16;
- DR4 – inclui os alelos DRB1*04 e DRB1*1410;
- DR52 – inclui os alelos DRB1*03, e DRB1*11, DRB1*12, DRB1*13, DRB1*14 e DRB1*08 (DR8);
- DR7 - DRB1*0701;
- DR9 - DRB1*09012;
- DR10 - DRB1*1001.

Após a definição destes grupos, as amostras são amplificadas utilizando iniciadores específicos para cada grupo.

Na amplificação genérica de HLA-DRB foram utilizados simultaneamente dois iniciadores a 5' (2DRBAMP-A₁ e A₂) em virtude de diferenças existentes entre as seqüências alélicas nesta posição. Em um volume final de 100µl foram adicionados: 1x tampão *Taq* (KCl 50mM, Tris-HCl 10mM, pH 8.3, MgCl₂ 1,5mM), 0,2mM de cada dNTP, 0,3µM dos iniciadores A₁ e A₂ e 0,6µM do iniciador B, 0,05 U/µl de *Taq* Gold (Applied Biosystems) e 2,5µl de DNA. As ciclagens foram efetuadas da seguinte forma: 1 ciclo inicial de desnaturação

do DNA a 94°C por 2 minutos e 30 segundos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e 10 minutos de extensão final a 72°C. As seqüências dos iniciadores usados são: *forward* (2DRBAMP-A₁ 5'CCCCACAGCACGTTTCTTG3' e 2DRBAMP-A₂ 5'CCCCACAGCACGTTTCCTG3'); e *reverse* (2DRBAMP-B 5'CCGCTGCACTGTGAAGCTCTC3') (Bignon & Fernandez-Viña, 1994).

2.5.3 Hibridização dos Genes HLA

Com o auxílio de uma pipeta multicanal de repetição (Eppendorf), 1,2µl do produto de PCR (HLA-DQB1 ou HLA-DRB1) foi aplicado em membranas Hybond-N+. Em cada membrana foram incluídos controles constituídos por amostras cujos alelos já haviam sido determinados. Em seguida as membranas foram desnaturadas em NaOH 0.4M por 3 minutos e hidratadas em SSPE 3x por 2 minutos. A fixação das amostras nas membranas foi realizada em um UV *Crosslinker* (Fisher Biotech).

O processo de hibridização foi realizado em garrafas de 200ml e forno de hibridização *Hybaid*. Inicialmente as membranas foram bloqueadas em 10ml de SSPE 0,1x - SDS 0,5%, durante 20 minutos, à 42°C. A solução então foi retirada e colocado 10ml da solução de hibridização (SSPE 5X - SDS 0,1% e 2 pmoles da sonda biotinilada) por 3 a 12 h. A T_m de cada oligonucleotídeo foi calculada a partir da seguinte expressão (Sambrook *et al.*, 1989):

$$T_m = 81,5 + 16,6(\log_{10}[Na^+]) + 0,41(\%G + C) - \frac{600}{N}$$

Após a hibridização, foram realizadas 3 lavagens de 10 minutos: A primeira sendo de baixo rigor à temperatura ambiente e as duas seguintes de alto rigor à temperatura de 44 ou

47°C, de acordo com a sonda utilizada. Nestas lavagens são utilizados 10ml de SSPE 2x - SDS 0,1%. Logo após, as membranas foram incubadas com uma solução contendo 4 µl (solução estoque de 1mg/ml) do conjugado *Horseradish peroxidase-Streptavidin* (Dyna) para 90ml de SSPE 2x - SDS 0,1%, durante 20 minutos à temperatura ambiente. Logo após, as membranas foram submetidas a 3 lavagens com 10ml de SSPE 2x - SDS 0,1% à temperatura ambiente, para retirada de excesso de conjugado. A primeira por 5 minutos e as seguintes por 10 minutos. Em seguida, as membranas foram retiradas das garrafas de hibridização e colocadas todas juntas, em SSPE 2x - SDS 0,1%.

A revelação foi feita através de quimioluminescência, utilizando o *Kit ECL – Direct Nucleic acid Labelling and Detection System* (Amersham Life Science). Onde foi colocado 0,5ml de solução A e 0,5ml de solução B sobre a membrana. Em seguida, o filme de raio-X Kodak X-Omat K XK-1 é exposto às membranas por 10 minutos, uma segunda exposição é feita, variando de 30 a 60 minutos.

A remoção das sondas foi feita pelo aquecimento por 10 minutos das membranas a 70°C em água Mili-Q, após este procedimento as membranas podem ser reutilizadas. Algumas vezes, foi necessário realizar algumas variações no protocolo original. Estas variações foram baseadas no comportamento de cada sonda. Para algumas destas, foi utilizado TMACl (cloreto de amônia tetrametilado) na fase de hibridização com modificações na temperatura de hibridização e lavagem de acordo com a T_m da sonda.

O 12º *Workshop* Internacional de Histocompatibilidade (12º IHWC) recomenda o uso de 36 sondas para a caracterização dos alelos HLA-DQB1. Na tipagem do gene HLA-DRB1 são recomendadas 30 sondas para a tipagem genérica e 98 para a tipagem específica dos grupos de HLA-DRB1 (DR1, DR2, DR4 e DR52) (Bignon & Fernandez-Viña, 1994). Resultados favoráveis foram obtidos com um total de 27 sondas para HLA-DQB1 e 111

sondas para HLA-DRB1 (tipagem genérica e específica), o que permitiu uma boa definição dos alelos.

2.6 Análise Estatística

2.6.1 No Estudo de Associação dos Genes HLA com o CCU

Os dados foram analisados através de tabela de contingência, do tipo 2 x 2. A magnitude de associação entre os alelos HLA-DQB1 e HLA-DRB1 com o CCU foi estimada através da razão de chance (“odds ratio” – OR) e seu respectivo intervalo de confiança (IC95%), usando o software SPSS 13.0 (SPSS, Chicago, IL).

	Portadores do grupo HLA analisado	Não-portadores do grupo HLA analisado	
Casos	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 razão de probabilidade de uma paciente com CCU ser portadora de um determinado grupo HLA. O cálculo da OR, diferente 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 de determinado alelo é a mesma de não

ser portadora. Valores acima de 1, indicam uma maior probabilidade de ser portadora do alelo, e valores menores que 1, 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):

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

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 mais estreitos são mais precisos que intervalos mais largos.

As OR foram ajustadas para as variáveis idade e etnia (de acordo com o mtDNA) através de regressão logística não condicional.

2.6.2 Nas Estimativas de Contribuição Étnica

As frequências dos haplótipos e haplogrupos do mtDNA foram obtidas por simples contagem, assim como as frequências alélicas das STR.

A diferenciação genética entre casos e controles usando DNA nuclear (STR) foi estimada utilizando-se AMOVA - Análise de Variância Molecular (Excoffier *et al.*, 1992). A distância genética aplicada foi F_{ST} reformulada por Slatkin (1995), (R_{ST}), que incorpora o modelo de mutação SMM, implementados no programa ARLEQUIN (Schneider *et al.*, 2000). Valores de $F_{ST} = 0$ indicam completa homogeneidade entre os grupos comparados, $F_{ST} = 1$ completa diferenciação entre os grupos.

Quando o modelo SMM foi assumido, os alelos com repetições imperfeitas foram agrupados aos alelos com tamanhos mais próximos.

Para avaliar se as frequências genóticas das STR estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg foi aplicado o teste exato de Fischer como o reformulado por Guo & Thompson (1992), usando o programa ARLEQUIN.

As proporções de contribuição étnica de cada população parental para a população de Belém foram avaliadas por meio de dois estimadores: a) O primeiro é baseado nas frequências alélicas observadas nos *loci* de STR analisados em Belém e nas frequências alélicas das populações parentais (Europeus, Ameríndios e Africanos). Este método permite uma estimativa de mínimos quadrados das taxas de mistura genética usando probabilidades de identidade gênica (Chakraborty, 1985) modificado e adaptado para Windows por B. Bertoni, (Fac. Medicina, Univ de la República, Montevideo). Esta análise foi feita no programa ADMIX 95. b) O segundo estimador, é baseado no tempo de coalescência dos alelos, levando em consideração informações moleculares (divergência entre os alelos), além das frequências alélicas das populações híbrida e parental (Bertorelle & Excoffier, 1998; modificado por Dupanloup & Bertorelle, 2001). Estas proporções de mistura foram realizadas com o programa ADMIX 2.0. A significância destas estimativas foi obtida pelo método de randomização utilizando 10.000 replicatas (*bootstraps*).

3. RESULTADOS

3.1 Variantes de HPV-16

3.1.1 Distribuição das Variantes da LCR de HPV-16

A análise de sequenciamento da LCR viral permite a identificação de variantes moleculares pertencentes a 5 ramos filogenéticos: europeu (E), asiático-americano (AA), africano 1 (Af-1), africano 2 (Af-2) e asiático (A) (Ho *et al.*, 1993). A variabilidade na LCR na amostra total revelou 9 diferentes variantes pertencentes a 4 ramos filogenéticos (Junes, 2000). Estas correspondiam às variantes B-12, G-10, protótipo e Nova-2 (ramo E), B-2, B-14 e Nova-1 (ramo AA), T-8 (ramo Af-1) e S21-A (ramo Af-2) (Tabela 1). As variantes mais frequentes nos casos de CCU foram: B-2 (39,5%), B12 (19,8%) e o protótipo (17,3%). As outras variantes foram encontradas em menor frequência. Foram também observadas infecções por múltiplas variantes (Tabela 2). Nos casos foi observada uma frequência de 43,2% de variantes AA, seguido por 42% de variantes do ramo E e 4,9% de variantes Af. Estes isolados foram agrupados de acordo com os ramos filogenéticos como E e não-E (variantes dos ramos Af-1, Af-2 e AA), como AA e não-AA (E, Af-1, Af-2) e também como protótipo e não-protótipo. A proporção de variantes do ramo E e não-E foi de 48% e 53%, respectivamente. As variantes AA estiveram presentes em 41% das amostras e as não-AA em 48%. Já as variantes protótipo foram frequentes em 18% dos espécimes e as variantes não-protótipo em 71%. Nos controles, 16 amostras foram positivas para HPV-16. Em 11 destes espécimes foi possível identificar 4 variantes de HPV-16 (B-2, protótipo, B-12 e G-10). A frequência de variantes do ramo E foi de 82% (n=9) seguido de 18% (n=2) da variante do ramo asiático-americano B-2.

Tabela 1. Padrão de substituição nucleotídica das variantes da LCR de HPV-16 encontradas em Belo (PA).

	7 4 8 5	7 4 8 9	7 5 0 7	7 5 2 1	7 5 5 2	7 6 6 9	7 6 8 9	7 7 2 9	7 7 4 3	7 7 6 4	7 7 8 6	7 7 9 2	7 8 2 6	7 8 3 4	7 8 3 7	7 8 3 9	R a m o
Sítio de ligação a fatores de transcrição	GRE/YY1			YY1			TEF-1		TEF-1		TEF-1		YY1			Oct-1	
Protótipo	A	G	A	G	G	C	C	A	T	C	C	C	G	G	A	A	E
B-12	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E
G-10	.	.	.	A	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E
Nova-2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	E
B-14	C	A	G	A	.	T	A	C	.	T	T	.	.	.	.	.	AA
B-2	C	A	.	A	.	T	A	C/T	G	T	T	.	.	.	.	.	AA
Nova-1	C	A	.	A	.	T	A	C	.	T	T	.	.	T	.	.	AA
T-8	.	A	.	A	.	.	A	.	.	T	T	.	.	T	.	.	Af-1
S-21A	C	A	.	A	.	T	.	.	.	T	T	.	A	T	C	G	Af-2

Cada linha representa uma variante genômica.

Os números no topo identificam as posições nucleotídicas onde as mutações foram detectadas no segmento 7478-7841 da LCR de HPV-16.

Europeu (E), africano (Af), asiático-americano (AA). Nova-1 = relacionada à variante ANb-16; Nova-2 = relacionada à variante IND-5.

Tabela 2. Frequência das variantes da LCR de HPV-16 nas amostras de NIC III e CCU.

Ramo Filogenético	Variantes	NIC III (n=18)		CCU (n=63)		Total (n=81)	
		N	%	N	%	N	%
Europeu	Protótipo	4	22,2	10	15,9	14	17,3
	B-12	2	11,1	14	22,2	16	19,8
	G-10	0	0	2	3,2	2	2,5
	Nova-2	2	11,1	0	0	2	2,5
	Total	8	44,4	26	41,3	34	42,0
Asiático- Americano	B-2	4	22,2	28	44,4	32	39,5
	B-14	0	0	1	1,6	1	1,2
	Nova-1	2	11,1	0	0	2	2,5
	Total	6	33,3	29	46,0	35	43,2
Africano-1	T-8	0	0	1	1,6	1	1,2
Africano-2	S21-A	2	11,1	1	1,6	3	3,7
	Total	2	11,1	2	3,2	4	4,9
	*Protótipo/B-2	1	5,6	1	1,6	2	2,5
	*Protótipo/G-10	1	5,6	0	0	1	1,2
	*Protótipo/S21-A	0	0	1	1,6	1	1,2
	*B-2/B-12	0	0	4	6,3	4	4,9
	Total	2	11,1	6	9,5	8	9,9

*Infecção por múltiplas variantes.

3.1.2 Análise do Polimorfismo na Posição 350 do Gene E6 de HPV-16

A frequência do polimorfismo do gene E6 350T →G em 76 amostras HPV-16 positivas mostrou uma distribuição uniforme nesta amostra de CCU e NIC III. A substituição E6350T foi encontrada em 43,6% (n=34) das amostras e E6350G foi encontrada em 56,4% (n=44) dos espécimes (Junes, 2000). A frequência do polimorfismo 350T→G também foi estudada quanto à sua distribuição nas variantes da LCR de HPV-16. A presença da substituição 350G foi de 94,3% nos isolados do ramo AA (33/35). Já nos isolados não-AA, a frequência deste polimorfismo foi de 25,6% (32/44), esta diferença foi significativa ($p<0,001$). Todos os isolados dos ramos Af e E, incluindo o protótipo, hibridizaram com a sonda 350T, com exceção das amostras positivas para a variante B-12 que hibridizou em frequência similar com as duas sondas. Dos isolados positivos para a variante B-2, apenas um hibridizou com a sonda 350T.

3.2 Análise do mtDNA

As amostras foram tipadas para os 9 sítios polimórficos do mtDNA (663 *HaeIII*, 3.592 *HpaI*, 5.176 *AluI*, 13.259 *HincII*, 7.025 *AluI*, 12.308 *HinfI*, 13.366 *BamHI*, 13.704, *BstNI* e deleção de 9 pb). A primeira etapa na determinação da origem étnica consistiu na identificação dos haplótipos e haplogrupos (A, B, C, D, L, H, I, J, K, T, U, V) do mtDNA nas amostras normais e de CCU. De 397 amostras, 377 foram tipadas com sucesso. A Tabela 3 mostra os haplótipos e haplogrupos encontrados a partir das análises de RFLP. Um total de 7 haplótipos foi definido na amostra total.

Tabela 3. Haplótipos e haplogrupos mitocondriais observados nas amostras de Belém.

Sítios	Haplótipos (Haplogrupos)						
	L3 (L)*	L	B	A	C	D	Não A-D
Deleção 9 pb	-	+	+	-	-	-	-
3592 <i>HpaI</i>	+	+	-	-	-	-	-
663 <i>HaeIII</i>	-	-	-	+	-	-	-
13259 <i>HincII</i>	+	+	+	+	-	+	+
5176 <i>AluI</i>	+	+	+	+	+	-	+

*Este haplótipo pertence ao haplogrupo L, caracterizados pela mutação 3592 *HpaI*.

Em azul: mutações que definem os haplogrupos A, B, C, D e L.

Inclui todas as amostras selecionadas de esfregaços normais e de CCU.

As amostras que não apresentaram mutações específicas de ameríndios ou africanos (agrupadas como não A-D), foram posteriormente submetidas à análise por RFLP utilizando 4 marcadores de mtDNA específicos de haplogrupos europeus (7.025 *AluI*, 12.308 *Hinfl*, 13.366 *BamHI*, 13.704 *BstNI*) para uma melhor caracterização. Neste grupo, foram encontradas 5 combinações haplotípicas, todas de origem européia (Tabela 4).

Tabela 4. Haplótipos mitocondriais de amostras agrupadas como não A-D.

Sítios	Haplótipos (Haplogrupos não A-D)				
	I	II	III	IV	V
13704 <i>Bst</i> NI	+	+	+	+	-
7025 <i>Alu</i> I	+	+	+	-	+
12308 <i>Hinf</i> I	+	+	-	+	+
13366 <i>am</i> HI	+	-	-	-	-

3.2.1 Estimativa de Mistura Interétnica Baseada no mtDNA

Estudos utilizando RFLP do mtDNA em várias populações humanas têm revelado um número estável de sítios polimórficos nas regiões codificadoras do mtDNA. Estes sítios definem grupos relacionados do mtDNA e são denominados haplogrupos, sendo a maioria destes específicos de cada continente.

Na Figura 4 encontram-se as frequências de cada haplótipo e os respectivos haplogrupos mitocondriais observados em 377 espécimes tipados.

Figura 4. Frequência dos haplogrupos do mtDNA observados nas amostras de Belém.
Inclui um total de 377 amostras de esfregaços normais (n= 282) e de CCU (n=95).

Nesta amostra de Belém, dois haplótipos de origem africana foram encontrados em 78 indivíduos, o haplótipo L (3,7%) e o L3 (17%), ambos pertencentes ao haplogrupo L.

As linhagens A, B, C e D foram observadas em 227 indivíduos (60,2%), sendo linhagens específicas de ameríndios. Cerca de 72 indivíduos (19,1%) apresentaram linhagens do haplogrupo não A-D, provavelmente de origem européia. Para esclarecer a origem destas linhagens foram utilizados mais 4 sítios polimórficos específicos de europeus. A análise destes sítios revelou 4 combinações haplotípicas provenientes de haplogrupos específicos de europeus (H, U, T, K ou J). Entretanto, devido à utilização de um número reduzido de sítios polimórficos (4 sítios) para caracterizar este grupo, não foi possível classificar alguns haplótipos a determinados haplogrupos, como por exemplo, se o haplótipo V pertence ao haplogrupo K ou J (ver Tabela 4).

As estimativas de mistura interétnica foram obtidas pela simples contagem dos haplogrupos continente-específicos. Os resultados obtidos a partir do grupo de amostras total (n=377) demonstram que pelo menos 60,2% das linhagens mitocondriais da população de Belém são específicas de populações indígenas. Aproximadamente 20,7% e 19,1% das linhagens resultam da presença de haplogrupos africanos e europeus, respectivamente. Na Figura 5 encontra-se a distribuição étnica das amostras analisadas no estudo de associação com o HLA de acordo com o mtDNA.

Figura 5. Contribuição étnica de acordo com o mtDNA entre casos e controles. ND= não definido. Um total de 382 amostras (95 casos e 287 controles) foi analisado no estudo de associação do HLA com o CCU, 11 amostras não definidas.

3.3 Análise da Estrutura Genética por STR

Em adição aos dados de mtDNA, as frequências polimórficas de 9 STR autossômicas (D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D18S51, D21S11, FGA e VWA), foram utilizadas em diferentes testes para verificar se casos e controles são comparáveis. Das 397 amostras submetidas a tipagem das STR, um total de 286 espécimes (198 controles e 88 casos) foi caracterizado com sucesso. Cerca de 111 amostras não foram definidas devido à má qualidade do DNA ou problemas na amplificação do DNA. As Tabelas 5 e 6 mostram a distribuição das frequências alélicas dos diferentes *loci* analisados. A comparação das frequências alélicas entre casos e controles podem ser visualizadas nas Figuras 6 e 7.

Tabela 5. Distribuição das frequências alélicas de 9 STR nos casos de CCU e NIC III.

Alelo	D3S1358	vWA	FGA	D81179	D21S11	D18S51	D5S818	D13S317	D7S820
#n	n= 174	n= 170	n= 158	n= 171	n= 172	n= 170	n=171	n= 170	= 172
6						0,002			
7						-	0,012		
8						-	0,058	0,059	0,180
9				0,012		-	0,135	0,165	0,076
10				0,093		0,006	0,064	0,094	0,244*
11		0,006		0,041		0,012	0,269*	0,247*	0,233*
12		-		0,145		0,094	0,292*	0,259*	0,250*
13		0,006		0,267*		0,135	0,158	0,124	0,012
14	0,091	0,076		0,256*		0,171*	0,006	0,053	0,006
15	0,426*	0,076		0,145		0,165	-		
15.2	-	-		-		-	-		
16	0,267*	0,341*		0,035		0,065	0,006		
17	0,159*	0,241*				0,194*			
18	0,040	0,176*	0,006			0,088			
18.2	-	-	-			-			
19	0,006	0,059	0,101			0,029			
20		0,012	0,119			0,018			
21		0,006	0,094			0,012			
22			0,138*			-			
22.2			0,006			-			
23			0,145*			0,006			
23.2			-			-			
24			0,151*						
25			0,138*						
26			0,088						
27			0,006		0,035				
28					0,110				
29					0,203*				
29.2					-				
30					0,238*				
30.2					0,017				
31					0,122				
31.2					0,093				
32					-				
32.2					0,122				
33					0,006				
33.2					0,035				
34					-				
34.2					0,006				
35					0,012				
nd	0,011		0,006	0,006					
Total	1,000	0,999	0,998	1,000	0,999	1,001	1,000	1,001	1,001

*Frequências alélicas mais elevadas em cada *locus* de STR.

2n

Tabela 6. Distribuição das frequências alélicas de 9 STR nos controles.

Alelo	D3S1358	vWA	FGA	D81179	D21S11	D18S51	D5S818	D13S317	D7S820
#n	n= 396	n= 396	n= 396	n= 396	n=396	n= 396	n= 396	n= 396	= 396
6									
7									
8				0.003			0.083		0.013
9				0.003			0.030	0.071	0.101
10				0.078			0.063	0.184	0.131
11		0.003		0.061		0.008	0.053	0.063	0.258*
12		-		0.129		-	0.313*	0.250*	0.258*
13		0.005		0.283*		0.116	0.311*	0.235*	0.220*
14	0.076	0.058		0.288*		0.109	0.131	0.124	0.018
15	0,381*	0,119		0.129		0,220*	0,015	0.073	0,003
15.2	0,003	-		-		0,164*			
16	0,268*	0,323*		0.023		-			
17	0.192	0.285*	0.005	0.005		0.098			
18	0,066	0.149	0.015			0.144			
18.2	-	-	0.005			0.056			
19	0,015	0.053	0.076			-			
20		-	0.078			0.040			
21		0.005	0.134*			0.023			
22			0.114			0.015			
22.2			0.005			-			
23			0.114			-			
23.2			0.003			-			
24			0,192*			0.003			
25			0,131*			0.003			
26			0,106			0.003			
27			0.008		0.023				
28			0,013		0,141				
29			0,003		0,225*				
29.2					-				
30					0.245*				
30.2					0.028				
31					0,056				
31.2					0.093				
32					0.013				
32.2					0,104				
33					-				
33.2					0.056				
34					-				
34.2					0.008				
35					0.010				
nd									
Total	1.001	1.000	1.002	1.002	1.002	1.002	0,999	1.000	1.002

*Frequências alélicas mais elevadas em cada *locus* de STR.

2n

Figura 6. Comparação da distribuição das frequências alélicas das STR D3S1358, vWA, FGA e D8S1179 entre amostras normais e de CCU e NIC III. Amostras normais: 2n=396; CCU e NIC III: D3S1358 (2n=174), vWA (2n=170), FGA (2n=158), D8S1179 (2n=171).

Figura 7. Comparação da distribuição das frequências alélicas das STR D21S11, D18S51, D5S818, D13S317 e D7S820 entre amostras normais e de CCU e NIC III. Amostras normais: 2n=396; CCU e NIC III: D21S11 (2n=172), D18S51 (2n=170), D5S818 (2n=171), D13S317 (2n=170), D7S820 (2n=172).

Para determinar se as frequências genotípicas dos *loci* de STR analisados desviaram-se do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado o teste de Guo & Thompson (1992), o qual analisa a adequação das frequências genotípicas observadas com seus respectivos equilíbrios de Hardy-Weinberg. Foram observados desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg para os *loci* vWA e D13S317, o *locus* D81179 foi marginalmente significativo (Tabela 7).

Tabela 7. Análise por *locus* do equilíbrio de Hardy-Weinberg entre casos e controles.

<i>Loci</i>	*Heter. Observada	Heter. Esperada	Valores de p°	Desvio Padrão
Controles				
D3S1358	0,76	0,74	0,378	0,0014
vWA	0,78	0,77	0,077	0,0011
FGA	0,83	0,88	0,334	0,0007
D81179	0,76	0,80	0,467	0,0011
D21S11	0,82	0,81	0,458	0,0009
D18S51	0,85	0,86	0,605	0,0011
D5S818	0,75	0,78	0,068	0,0006
D13S317	0,83	0,82	0,871	0,0009
D7S820	0,84	0,79	0,903	0,0010
Casos				
D3S1358	0,69	0,71	0,971	0,0006
vWA	0,71	0,79	<u>0,010</u>	0,0002
FGA	0,83	0,87	0,844	0,0009
D81179	0,85	0,81	<u>0,053</u>	0,0005
D21S11	0,74	0,82	0,097	0,0006
D18S51	0,84	0,87	0,766	0,0007
D5S818	0,70	0,78	0,384	0,0007
D13S317	0,65	0,82	<u>0,013</u>	0,0003
D7S820	0,73	0,79	0,873	0,0008

* Heterozigosidade;

Teste exato de Fischer usando a cadeia de Markov para todos os *Loci* (Guo & Thompson, 1992);

$^{\circ}$ Valores de significância para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, onde $p > 0,05$ está em equilíbrio e $p < 0,05$ não está em equilíbrio.

É possível que o desequilíbrio de Hardy-Weinberg observado nos referidos *loci* tenha decorrido do fato de que muitos dos alelos observados têm frequência reduzida. Essa é uma propriedade intrínseca aos *loci* de VNTR que geralmente segregam um grande número de alelos, sendo na sua grande maioria alelos raros (Chakraborty, 1992). Entretanto, ao considerar apenas os alelos com frequência igual ou superior a 2%, não foram observados desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg. É importante também ressaltar que estes *loci* não se encontram em desequilíbrio de ligação.

3.3.1 Empregando Frequências Genotípicas da População Híbrida

A diferenciação genética entre casos e controles foi estimada usando AMOVA. Os resultados mostram que a diferença genética dentro do grupo como um todo é maior do que a diferença genética observada entre casos e controles. Sendo observada uma percentagem de variação de 100,32% e -0,32%, respectivamente. O índice de fixação considerando todos os *loci* apresentou resultado negativo, $F_{ST} = -0,0032$, indicando que não há diferenças significativas entre casos e controles (Tabela 8).

Tabela 8. Diferenciação genética na população de Belém

Fonte da Variação	Componentes de Variança	Percentagem de variação	F_{ST} Total
Interpopulação	-0,0831	-0,30	
Intrapopulação	26,2064	100,32	-0,0032

3.3.2 Empregando Frequências alélicas das Populações Híbrida e Parentais

A estimativa de contribuição étnica é baseada na distribuição diferencial das frequências alélicas de cada *locus* levando em consideração as frequências alélicas das populações parentais (Shriver *et al.*, 1997). Para tanto, foi construído um banco de dados de frequências alélicas das populações que originaram a cidade de Belém. A organização destes dados foi baseada na literatura e incluem amostras de origem européia (Entrala, *et al.*, 1998; Gusmão *et al.*, 2000; Geada *et al.*, 2000; Amorim *et al.* 2001; Sanz *et al.*, 2001; Pérez-Miranda *et al.*, 2005), ameríndia (Hutz, *et al.*, 2002) e africana (Destro-Bisol *et al.*, 2000; Pérez-Lezaun *et al.*, 2000; Alves *et al.*, 2001; Farfán *et al.*, 2001; Geada *et al.*, 2003; Tofanelli *et al.*, 2003).

A análise das STR pelo método de identidade gênica (Chakraborty *et al.*, 1975) demonstra que 37% dos casos são de origem ameríndia, seguido por 34% de europeu e 29% de africano. Em relação aos controles, cerca de 45% são de origem européia, 32% de origem ameríndia e 23% de origem africana. Os resultados mostram uma pequena inversão na contribuição étnica entre casos e controles, onde os ameríndios são encontrados em maior frequência nos casos (37%) e os europeus são encontrados em maior frequência nos controles (45%).

Outra análise foi realizada, desta vez usando o método sugerido por Bertorelle & Excoffier (1998). A taxa de mutação assumida para as STR foi de 10^{-3} //locus/gameta/geração e o tempo de miscigenação de 400 anos, período em que a cidade de Belém foi fundada. Utilizando este método, a contribuição étnica observada neste grupo de amostra de Belém foi de 32,4% de europeus, 35,4% de ameríndio e 32,2% de africanos nos casos. A contribuição nos controles foi quase idêntica, com 32,3% de contribuição européia, 35,3% de ameríndios e 32,4% de africanos. A Tabela 9 mostra a contribuição étnica usando diferentes abordagens.

Tabela 9. Proporções de ancestralidade do DNA nuclear e mtDNA

Ancestralidade	Casos		Controles	
	%		%	
	Proporção	Erro Padrão	Proporção	Erro padrão
STR Método 1				
Européia	34,0	0,004	45,0	0,021
Ameríndia	37,0	0,002	32,0	0,025
Africana	29,0	0,004	23,0	0,010
STR Método 2				
Européia	32,4	0,003	32,3	0,002
Ameríndia	35,4	0,004	35,3	0,003
Africana	32,2	0,003	32,4	0,002
mtDNA				
Européia	16,8	-	19,2	-
Ameríndia	57,9	-	58,5	-
Africana	25,3	-	18,5	-

Método 1: Chakraborty (1985).

Método 2: Bertorelle & Excoffier (1998).

3.4 Análise dos Genes HLA-DQB1 e HLA-DRB1 e o Desenvolvimento de CCU

Este estudo compreendeu uma amostra proveniente de Belém, capital do Estado do Pará, uma área que apresenta uma das maiores taxas de incidência do câncer cervical no Brasil.

Com o objetivo de avaliar uma possível associação entre o polimorfismo de genes HLA de classe II e o risco de CCU, um total de 95 biópsias de CCU e 297 esfregaços normais foram selecionados para este estudo. Algumas amostras foram eliminadas por problemas de amplificação do DNA ou na hibridização. Desta forma, foram analisados 95 CCU (casos) e um grupo controle constituído por: 190 esfregaços cervicais HPV negativos e 97 esfregaços HPV positivos. A Tabela 10 mostra a distribuição das variáveis sociodemográficas de idade e grupo étnico entre os casos e controles. A diferença de idade entre casos e controles foi

significativamente diferente, com uma média de 50,2 e 36,9 anos, respectivamente ($p < 0,001$). Já a distribuição dos três grupos étnicos entre casos e controles foi estatisticamente comparável ($p = 0,426$), apesar da maior proporção de mulheres africanas nos casos.

Para fins de análise os casos foram divididos em dois grupos: i) todos os casos: que inclui pacientes com neoplasia intraepitelial cervical de grau III (NIC III ou carcinoma *in situ*) e pacientes com carcinoma epidermóide invasor do colo uterino (CCU); ii) CCU: inclui somente pacientes com carcinoma epidermóide invasor (Tabelas 11 e 12). Nas Tabelas 11 e 12 as distribuições dos grupos e alelos HLA-DQB1 e HLA-DRB1 entre casos e controles são comparados quanto ao risco de desenvolvimento de CCU. As amostras também foram estratificadas de acordo com a condição de infecção por HPV: i) CCU e NIC III HPV-16 positivos; ii) somente CCU HPV-16 positivo (Tabelas 13 e 14). Os controles também foram divididos em 2 grupos: i) mulheres com citologia normal positivas para qualquer tipo de HPV; ii) mulheres com citologia normal HPV-16 positivas. A comparação desta análise foi feita utilizando os controles HPV negativos (Tabelas 17-19).

Tabela 10. Distribuição sócio-demográfica no estudo caso-controle.

Variáveis		Casos n=95	Controles n=287	Valor de p ^b
Idade em anos	Média	50,2	36,9	p<0,001
	Mediana	49,0	37,0	
	Desv. Padrão	14,0	4,7	
	Ameríndio	51,6	36,8	p<0,001
	Europeu	50,7	37,0	p<0,002
	Africano	46,9	37,4	p<0,004
Grupo Étnico ^a	Europeu	16 (16,8%)	55 (19,2%)	p=0,426
	Ameríndio	55 (57,9%)	168 (58,5%)	
	Africano	24 (25,3%)	53 (18,5%)	
	ND	0	11 (3,8%)	

^a Baseado na análise do polimorfismo do mtDNA; ND= não definido.

^b Teste do Qui-quadrado

Tabela 11. Razões de chances (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC) para CCU de acordo com HLA-DRB1.

DRB1 alelos	Controles		CCU e N1C III			CCU		
	*n=283	*n= 94	Bruta	Ajustada ^a	*n=73	Bruta	Ajustada ^a	
			OR (95% IC)	OR (95% IC)		OR (95% IC)	OR (95% IC)	
*01	52/231	9/85	0,47 (0,22-1,00)	0,44 (0,17-1,15)	6/67	0,40 (0,16-0,97)	0,25 (0,07-0,91)	
*0101	27/256	5/89	0,53 (0,20-1,43)	0,44 (0,13-1,51)	4/69	0,55 (0,19-1,62)	0,38 (0,09-1,65)	
*0102	23/260	3/91	0,37 (0,11-1,27)	0,29 (0,05-1,78)	2/71	0,32 (0,07-1,38)	0,11 (0,01-1,78)	
*03	45/238	10/84	0,63 (0,30-1,31)		6/67	0,47 (0,19-1,16)		
*0301	37/246	7/87	0,53 (0,23-1,24)		4/69	0,38 (0,13-1,12)		
*0302	6/277	3/91	1,52 (0,37-6,21)		2/71	1,30 (0,26-6,58)		
*04	74/209	31/63	1,39 (0,84-2,30)		28/45	1,76 (1,02-3,02)	1,39 (0,66-2,91)	
*0401	5/278	5/89	3,12 (0,88-11,04)	5,58 (1,03-30,28)	4/69	3,22 (0,84-12,32)	4,59 (0,63-33,24)	
*0403	5/278	2/92	1,21 (0,23-6,34)		2/71	1,57 (0,30-8,24)		
*0404	20/263	7/87	1,06 (0,43-2,59)		7/66	1,39 (0,57-3,44)		
*0405	5/278	0/94	IND		0/73	IND		
*0407	4/279	3/91	2,30 (0,51-10,47)		3/73	2,99 (0,65-13,66)		
*0411	33/250	15/79	1,44 (0,74-2,79)	1,02 (0,40-2,57)	14/59	1,80 (0,90-3,57)	1,39 (0,51-3,83)	
*0701	51/232	22/72	1,39 (0,79-2,45)		15/58	1,18 (0,62-2,24)		
*08	63/220	21/73	1,01 (0,57-1,76)		14/59	0,83 (0,43-1,58)		
*0801	8/275	1/93	0,37 (0,05-3,00)		1/72	0,48 (0,06-3,88)		
*0802	16/267	6/88	1,14 (0,43-3,00)		5/68	1,23 (0,43-3,47)		
*0804	29/254	12/82	1,28 (0,63-2,63)		6/67	0,78 (0,31-1,97)		
*09012	13/270	2/92	0,45 (0,10-2,04)		2/71	0,58 (0,13-2,65)		
*1001	13/270	4/90	0,92 (0,29-2,90)		2/71	0,58 (0,13-2,65)		
*11	41/242	17/77	1,30 (0,70-2,42)		13/60	1,28 (0,65-2,54)		
*1101	22/261	10/84	1,41 (0,64-3,10)		6/67	1,06 (0,41-2,72)		
*1102	8/275	3/91	1,13 (0,29-4,36)		3/70	1,47 (0,38-5,70)		

Tabela 11. (Continuação)

DRB1 alelos	Controles		CCU e NIC III			CCU		
	*n=283	*n=94	Bruta OR (95% IC)	Ajustada ^a OR (95% IC)	*n=73	Bruta OR (95% IC)	Ajustada ^a OR (95% IC)	
*1104	11/272	4/90	1,10 (0,34-3,54)		4/69	1,43 (0,44-4,64)		
*1201	11/272	0/94	IND		0/73	IND		
*13	63/220	9/85	0,37 (0,18-0,78)	0,49 (0,20-1,21)	8/65	0,43 (0,19-0,94)	0,67 (0,25-1,78)	
*1301	29/254	2/92	0,19 (0,05-0,81)	0,32 (0,07-1,57)	2/71	0,25 (0,06-1,06)	0,49 (0,10-2,55)	
*1302	21/262	4/90	0,55 (0,19-1,66)	0,54 (0,15-1,99)	4/69	0,72 (0,24-2,18)	0,85 (0,22-3,22)	
*1303	9/274	2/92	0,66 (0,14-3,12)		2/71	0,86 (0,18-4,06)		
*14	30/253	11/83	1,12 (0,54-2,33)		10/63	1,34 (0,62-2,88)		
*1401	5/278	2/92	1,21 (0,23-6,34)		2/71	1,57 (0,30-8,24)		
*1402	21/262	8/86	1,16 (0,50-2,72)		7/66	1,32 (0,54-3,24)		
*15	27/256	17/77	2,09 (1,08-4,04)	3,32 (1,48-7,44)	13/60	2,05 (1,00-4,22)	3,64 (1,48-8,96)	
*1501	11/272	14/80	4,33 (1,89-9,91)	8,52 (3,10-23,43)	11/62	4,39 (1,82-10,58)	8,18 (2,66-25,15)	
*1503	17/266	3/91	0,52 (0,15-1,80)	0,53 (0,11-2,50)	2/71	0,44 (0,10-1,95)	0,80 (0,16-3,92)	
*16	27/256	14/80	1,66 (0,83-3,32)	2,24 (0,92-5,46)	12/61	1,87 (0,89-3,89)	2,69 (0,99-7,35)	
*1601	9/274	1/93	0,33 (0,04-2,62)	1,18 (0,14-10,07)	1/72	0,42 (0,05-3,39)	1,94 (0,22-17,09)	
*1602	18/265	13/81	2,36 (1,11-5,03)	2,53 (0,95-6,73)	11/62	2,61 (1,17-5,81)	2,80 (0,93-8,43)	

^a OR e IC 95% ajustados por idade e etnia (mtDNA) foram estimados por regressão logística não condicional.

* n= Número de indivíduos portadores/número indivíduos não portadores do alelo.

Tabela 12. Razões de chances (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC) para CCU de acordo com HLA-DQB1.

DQB1 Alelos	Controles		CCU E NIC III		*n=74	CCU	
	*n=287	*n=95	Bruta OR (95% IC)	Ajustada ^a OR (95% IC)		Bruta OR (95% IC)	Ajustada ^a OR (95% IC)
*0201	87/200	28/67	0,96 (0,58-1,60)		18/56	0,74 (0,41-1,33)	
*03	166/121	67/28	1,74 (1,06-2,87)	1,39 (0,75-2,60)	57/17	2,44 (1,35-4,41)	1,87 (0,88-4,00)
*0301	93/194	49/46	2,22 (1,39-3,56)	1,69 (0,93-3,07)	40/34	2,46 (1,46-4,13)	1,74 (0,87-3,48)
*0302	63/224	25/70	1,27 (0,74-2,17)		24/50	1,71 (0,97-2,99)	1,33 (0,61-2,91)
*03032	16/271	4/91	0,75 (0,24-2,28)		3/71	0,72 (0,20-2,52)	
*04	65/222	25/70	1,22 (0,72-2,08)		18/56	1,10 (0,60-2,00)	
*0402	64/223	25/70	1,24 (0,73-2,12)		18/56	1,12 (0,61-2,04)	
*05	94/193	17/78	0,45 (0,25-0,80)	0,60 (0,29-1,23)	12/62	0,40 (0,20-0,77)	0,55 (0,23-1,30)
*0501	75/212	13/82	0,45 (0,24-0,85)	0,58 (0,26-1,31)	8/66	0,34 (0,16-0,75)	0,42 (0,15-1,19)
*0502	13/274	3/92	0,69 (0,19-2,47)	1,34 (0,33-5,40)	3/71	0,89 (0,23-3,21)	2,08 (0,50-8,70)
*0503	6/281	2/93	1,01 (0,20-5,08)		2/72	1,30 (0,26-6,58)	
*06	76/211	25/70	0,99 (0,59-1,68)		19/55	0,96 (0,53-1,72)	
*0602	35/252	21/74	2,04 (1,12-3,72)	3,49 (1,65-7,37)	15/59	1,83 (0,94-3,57)	3,65 (1,55-8,55)
*0603	24/263	1/94	0,12 (0,02-0,87)	0,25 (0,03-1,97)	1/73	0,15 (0,02-1,13)	0,39 (0,05-3,13)
*0604	13/274	1/94	0,22 (0,03-1,74)	0,07 (0,03-1,75)	1/73	0,29 (0,04-2,24)	0,07 (0,00-3,24)
*06051/09	3/284	2/93	2,04 (0,34-12,37)		2/72	2,63 (0,43-16,03)	

^a OR e IC 95% ajustados por idade e etnia (mtDNA) foram estimados por regressão logística não condicional.

* n= Número de indivíduos portadores/número indivíduos não portadores do alelo.

A análise bruta dos dados de HLA-DRB1 demonstrou um aumento da frequência dos alelos dos grupos HLA-DRB1*01 e DRB1*13 (especialmente DRB1*1301) nos controles e após o ajuste por idade e etnia esta diferença não foi significativa. Entretanto, quando as amostras de CCU foram analisadas separadamente o grupo DRB1*01 revelou um efeito protetor que foi mais acentuado após o ajuste por idade e etnia (OR=0,25; IC: 0,07-0,91). O mesmo não foi observado para os alelos do grupo DRB1*13 (Tabela 11).

Um risco aumentado de desenvolvimento de CCU foi observado para o alelo DRB1*0401 (OR=3,12). Este risco praticamente dobrou após o ajuste por idade e etnia (OR=5,58; IC: 1,03-30,28). Já na análise incluindo apenas amostras de CCU, este risco permaneceu elevado mas não foi significativo (OR=4,59; IC: 0,63-33,24).

Os alelos do grupo DRB1*15 também foram positivamente associados aos casos de CCU e NIC III (OR=3,32; IC: 1,48-7,44), e este risco se manteve quando analisados apenas os casos de CCU (OR=3,64; IC: 1,48-8,96). Neste estudo, o grupo DRB1*15 incluiu os alelos DRB1*1501 e DRB1*1503, entretanto, riscos elevados foram atribuídos somente ao alelo DRB1*1501, tanto nas amostras de CCU e NIC III (OR= 8,52; IC: 3,10-23,43) quanto nas amostras de CCU (OR=8,18; IC: 2,66-25,15).

O grupo DRB1*16 apresentou tendências de associação positiva com o desenvolvimento de CCU nos dois grupos de amostra (OR= 2,24; IC: 0,92-5,46 e OR= 2,69; IC: 0,99-7,35). Sendo uma importante contribuição a do alelo DRB1*1602 (Tabela 11).

Na análise bruta dos genes HLA-DQB1 observou-se um aumento da frequência dos alelos do grupo DQB1*03 nos casos, principalmente do alelo DQB1*0301 (OR=2,22 e OR=2,46). Entretanto, após o ajuste por idade e etnia esses resultados não foram significativos. Efeito inverso foi observado para os alelos do grupo DQB1*05, especialmente o alelo DQB1*0501 (Tabela 12).

Um risco elevado de desenvolvimento de CCU foi atribuído ao alelo DQB1*0602. A magnitude desta associação praticamente dobrou após o ajuste nos dois grupos de casos (OR=3,49; IC: 1,65-7,37 e OR=3,65; IC: 1,55-8,55). Este alelo encontra-se em desequilíbrio de ligação com DRB1*1501. Já o alelo DQB1*0603, o qual está ligado a DRB1*1301, apresentou uma maior proporção nos controles, entretanto, não foi observado um efeito protetor do mesmo após o ajuste (OR=0,25; IC: 0,03-1,97 e OR=0,39; IC: 0,05-3,13).

Para verificar se as associações observadas foram dependentes do tipo de HPV, as OR para os alelos HLA-DRB1 e DQB1 foram estimadas considerando somente os casos HPV-16 positivos (Tabelas 13 e 14). Este foi o tipo de HPV mais freqüente nesta amostra (85,3%).

Tabela 13. Razões de chances (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC) para CCU HPV-16 positivos de acordo com HLA-DRB1.

DRB1 alelos	Controles		CCU e NIC III HPV-16			CCU HPV-16		
	*n=283	*n=81	Bruta OR (95% IC)	Ajustada ^a OR (95% IC)	*n=62	Bruta OR (95% IC)	Ajustada ^a OR (95% IC)	
*01	52/231	8/73	0,49 (0,22-1,07)	0,48 (0,17-1,33)	5/57	0,39 (0,15-1,02)	0,24 (0,05-1,05)	
*0101	27/256	4/77	0,49 (0,17-1,45)	0,44 (0,11-1,70)	3/59	0,48 (0,14-1,64)	0,36 (0,07-1,96)	
*0102	23/260	3/78	0,43 (0,13-1,49)	0,35 (0,06-2,15)	2/60	0,38 (0,08-1,64)	0,12 (0,01-2,30)	
*03	45/238	7/74	0,50 (0,22-1,16)	0,57 (0,22-1,50)	5/57	0,46 (0,18-1,22)	0,58 (0,18-1,86)	
*0301	37/246	4/77	0,34 (0,12-1,00)	0,42 (0,12-1,44)	3/59	0,34 (0,10-1,13)	0,37 (0,08-1,75)	
*0302	6/277	3/78	1,77 (0,43-7,26)	1,50 (0,31-7,31)	2/60	1,54 (0,30-7,81)	1,74 (0,29-10,49)	
*04	74/209	26/55	1,33 (0,78-2,28)	1,11 (0,54-2,28)	23/39	1,67 (0,93-2,97)	1,36 (0,60-3,10)	
*0401	5/278	4/77	2,89 (0,76-11,02)	3,69 (0,55-24,89)	3/59	2,82 (0,66-12,16)	2,00 (0,22-18,55)	
*0403	5/278	2/79	1,41 (0,27-7,39)		2/60	1,85 (0,35-9,78)		
*0404	20/263	6/75	1,05 (0,41-2,71)		6/56	1,41 (0,54-3,67)		
*0405	5/278	0/81	IND		0/62	IND		
*0407	4/279	2/79	1,76 (0,32-9,82)		2/60	2,32 (0,41-12,98)		
*0411	33/250	14/67	1,58 (0,80-3,13)	1,16 (0,43-3,12)	13/49	2,01 (0,99-4,09)	1,59 (0,53-4,77)	
*07	51/232	21/60	1,59 (0,89-2,85)		14/48	1,33 (0,68-2,59)		
*08	63/220	18/63	1,00 (0,55-1,81)		12/50	0,84 (0,42-1,67)		
*09	13/270	2/79	0,53 (0,12-2,38)		2/60	0,69 (0,15-3,15)		
*10	13/270	4/77	1,08 (0,34-3,40)		2/60	0,69 (0,15-3,15)		
*11	41/242	12/69	1,03 (0,51-2,06)		9/53	1,00 (0,46-2,19)		
*12	11/272	0/81	IND		0/62	IND		

Tabela 13. (Continuação)

DRB1 alelos	Controles		CCU e NIC III HPV-16		*n=62	CCU HPV-16	
	*n=283	*n=81	Bruta OR (95% IC)	Ajustada ^a OR (95% IC)		Bruta OR (95% IC)	Ajustada ^a OR (95% IC)
*13	63/220	6/75	0,28 (0,12-0,67)	0,44 (0,16-1,22)	5/57	0,31 (0,12-0,80)	0,64 (0,20-2,02)
*1301	29/254	1/80	0,11 (0,01-0,81)	0,25 (0,03-1,97)	1/67	0,14 (0,02-1,07)	0,46 (0,06-3,68)
*1302	21/262	2/79	0,31 (0,07-1,38)	0,39 (0,08-1,84)	2/60	0,41 (0,09-1,82)	0,68 (0,14-3,31)
*14	30/253	9/72	1,05 (0,48-2,32)				
*15	27/256	15/66	2,15 (1,08-4,28)	3,03 (1,30-7,05)	11/51	2,04 (0,95-4,38)	3,18 (1,22-8,32)
*1501	11/272	13/68	4,73 (2,03-11,01)	8,66 (3,07-24,44)	10/52	4,75 (1,92-11,77)	8,32 (2,58-26,84)
*1503	17/266	2/79	0,39 (0,09-1,75)	0,28 (0,04-2,17)	1/61	0,26 (0,03-1,96)	0,41 (0,05-3,44)
*16	27/256	14/67	1,98 (0,98-3,99)	2,78 (1,12-6,90)	12/50	2,27 (1,08-4,79)	3,77 (1,32-10,74)
*1601	9/274	1/80	0,38 (0,05-3,05)	1,42 (0,16-12,19)	1/61	0,50 (0,06-4,01)	2,57 (0,28-26,21)
*1602	18/265	13/68	2,81 (1,31-6,03)	3,13 (1,16-8,45)	11/51	3,17 (1,41-7,12)	3,87 (1,23-12,14)

^a OR e IC 95% ajustados por idade e etnia (mtDNA) foram estimados por regressão logística não condicional.

* n= Número de indivíduos portadores/número indivíduos não portadores do alelo.

Tabela 14. Razões de chances (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC) para CCU HPV-16 positivos de acordo com HLA-DQB1.

DQBI Alelos	Controles		CCU e NIC III HPV-16		*n=63	CCU HPV-16	
	*n=287		*n=82			Bruta OR (95% IC)	Ajustada ^a OR (95% IC)
*0201	87/200		25/57	1,01 (0,59-1,72)	17/46	0,85 (0,46-1,56)	
*03	166/121		56/26	1,57 (0,93-2,64)	48/15	2,33 (1,25-4,36)	1,56 (0,69-3,54)
*0301	93/194		41/41	2,09 (1,27-3,43)	34/29	2,45 (1,41-4,25)	1,75 (0,82-3,72)
*0302	63/224		20/62	1,15 (0,64-2,04)	19/44	1,53 (0,84-2,82)	1,12 (0,46-2,73)
*03032	16/271		3/79	0,64 (0,18-2,26)	2/61	0,56 (0,12-2,48)	
*04	65/222		23/59	1,33 (0,76-2,32)	16/47	1,16 (0,62-2,18)	
*05	94/193		16/66	0,50 (0,27-0,91)	11/52	0,43 (0,22-0,87)	0,68 (0,27-1,70)
*0501	75/212		12/70	0,48 (0,25-0,94)	7/56	0,35 (0,15-0,81)	0,48 (0,15-1,49)
*0502	13/274		3/79	0,80 (0,22-2,88)	3/60	1,05 (0,29-3,81)	
*0503	6/281		1/81	0,58 (0,07-4,87)	1/62	0,75 (0,09-6,39)	
*0504	1/286		0/82	IND	0/63	IND	
*06	76/211		20/62	0,90 (0,51-1,58)			
*0602	35/252		18/64	2,02 (1,08-3,81)	12/51	1,69 (0,82-3,48)	3,31 (1,32-8,27)
*0603	24/263		1/81	0,13 (0,02-1,01)	1/62	0,18 (0,02-1,33)	0,50 (0,06-4,04)
*0604	13/274		0/82	IND	0/63	IND	

^a OR e IC 95% ajustados por idade e etnia (mtDNA) foram estimados por regressão logística não condicional.

* n= Número de indivíduos portadores/número indivíduos não portadores do alelo.

O padrão de associação dos genes HLA-DQB1 e DRB1 para casos HPV-16 positivos não diferiu do observado nas análises que incluíam todas as amostras.

Nesta análise não foi observado um efeito protetor do grupo DRB1*01 (OR=0,24; IC: 0,05-1,05). O alelo DRB1*0401 permaneceu com um risco elevado de desenvolvimento de CCU, entretanto, a associação observada na análise incluindo todos os casos foi diluída (OR=3,69; IC: 0,55-24,89) (Tabela 13).

A análise bruta do alelo DRB1*0411 nos casos só de CCU apresentou uma associação positiva marginal com o CCU (OR=2,01; IC: 0,99-4,09), mas após os ajustes por idade e etnia a OR ficou próxima da unidade, perdendo a significância.

A magnitude das associações envolvendo o alelo DRB1*1501 permaneceu a mesma nos casos HPV-16 positivos. Já os riscos observados para o alelo DRB1*1602 foram significativamente maiores tanto nas amostras que incluíam todos os casos (OR=3,13; IC: 1,16-8,45) quanto no grupo só de CCU (OR=3,87; IC: 1,23-12,14).

Sabe-se que alelos de diferentes genes HLA encontram-se em diferentes desequilíbrios de ligação. Assim, com o objetivo de separar tais efeitos entre os genes DRB1 e DQB1, foram investigadas as associações dos haplótipos DRB1-DQB1 mais frequentes encontrados na população de Belém. Na Tabela 15 está apresentada a análise bruta dos dados utilizando diferentes estratificações dos casos. A Tabela 16 mostra os dados ajustados por idade e etnia de acordo com o mtDNA.

Tabela 15. Razões de chances (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC) para CCU de acordo com os haplótipos HLA-DRB1-DQB1

Haplótipos DRB1-DQB1	Controles		CCU e NIC III		CCU		CCU	
	*n=283	*n=94	*n=73	*n=62	Bruta OR (95% IC)	Bruta OR (95% IC)	Bruta OR (95% IC)	Bruta OR (95% IC)
DR1								
01-05	51/190	8/76	5/60	4/50	0,31 (0,12-0,81)	0,30 (0,10-0,86)		
0101-0501	25/207	4/80	3/64	2/54	0,39 (0,11-1,33)	0,31 (0,07-1,33)		
0102-0501	22/208	3/81	2/65	2/55	0,29 (0,07-1,27)	0,34 (0,08-1,51)		
1001-0501	13/209	4/81	2/65					
DR8								
08-0301	7/148	4/35	3/27	3/23	2,35 (0,57-9,65)	2,76 (0,67-11,13)		
08-0402	50/208	16/64	10/51	9/43	0,82 (0,39-1,72)	0,87 (0,40-1,90)		
0801-0402	8/221	1/69	1/55					
0802-0402	12/217	4/67	3/53					
08041-0301	4/173	4/41	3/32	3/27	4,05 (0,87-18,98)	4,81 (1,02-22,66)		
08041-0402	25/217	9/66	4/53					
DR51								
15-0602	24/246	17/73	13/58	11/50	2,30 (1,10-4,78)	2,26 (1,04-4,90)		
1501-0602	10/249	14/73	11/58	10/50	4,72 (1,91-11,65)	4,98 (1,97-12,59)		
1503-0602	14/246	3/73	2/58	1/50	0,61 (0,13-2,74)	0,35 (0,05-2,73)		
1601-0502	9/271	1/91	1/70	1/59	0,43 (0,05-3,45)	0,51 (0,06-4,11)		
1602-0301	14/189	11/47	9/35	9/30	3,47 (1,39-8,64)	4,05 (1,61-10,18)		
1602-0502	3/256	2/80	2/61					

Haplótipos DRB1-DQB1	Controles		CCU e NIC III		CCU		CCU HPV-16	
	*n=283	*n=94	Bruta OR (95% IC)	*n=73	Bruta OR (95% IC)	*n=62	Bruta OR (95% IC)	
DR52								
0301-0201	35/196	7/67	0,59 (0,25-1,38)	4/56	0,40 (0,14-1,17)	3/46	0,37 (0,11-1,24)	
0302-0402	5/220	2/69	1,28 (0,24-6,72)	1/55	0,80 (0,09-6,99)	1/46	0,96 (0,11-8,38)	
11-0301	32/185	14/45	1,80 (0,89-3,65)	12/35	1,98 (0,93-4,22)	8/30	1,54 (0,65-3,66)	
11-0602	9/219	3/59	1,24 (0,33-4,72)	1/46				
1101-0301	13/186	7/45	2,23 (0,84-5,90)	5/35	2,04 (0,69-6,10)	4/30	1,91 (0,58-6,24)	
1101-0602	8/235	3/66	1,33 (0,34-5,17)	1/53				
1102-0301	8/193	3/47	1,54 (0,39-6,03)	3/35				
1104-0301	11/193	4/47	1,49 (0,46-4,90)	4/35				
1201-0501	8/207	0/81	IND	0/65				
13-06	44/195	5/66	0,34 (0,13-0,88)	5/51	0,43 (0,16-1,15)	2/45	0,20 (0,05-0,84)	
1301-0603	22/253	1/92	0,13 (0,02-0,94)	1/71	0,16 (0,02-1,22)	1/61	0,19 (0,00-1,22)	
1302-0604	9/260	1/90	0,32 (0,04-2,57)	1/69	0,42 (0,05-3,36)	0/60	IND	
1302-0605	3/262	2/90	0,82 (0,08-8,05)	2/69				
1401-05031	5/277	2/92	1,20 (0,23-6,31)	2/71				
1402-0301	21/193	7/47	1,37 (0,55-3,41)	6/35				
DR53								
04-0301	4/135	9/29	10,47 (3,02-36,35)	6/17	11,91 (3,05-46,5)	5/14	12,05 (2,90-50,13)	
04-0302	58/207	22/61	1,29 (0,73-2,27)	21/43	1,74 (0,96-3,17)	17/38	1,60 (0,84-3,03)	
0401-0301	2/191	3/45	6,37 (1,03-39,23)	2/33	5,79 (0,79-42,53)	2/29	6,59 (0,89-49,59)	
0401-0302	2/219	2/67	3,27 (0,45-23,65)	2/48				
0403-0302	5/222	2/70	1,27 (0,21-6,68)	2/50				

Tabela 15. (Continuação)

Haplótipos DRB1-DQB1	Controles	CCU e NIC III		CCU		CCU HPV-16	
	*n=283	*n=94	Bruta OR (95% IC)	*n=73	Bruta OR (95% IC)	*n=62	Bruta OR (95% IC)
0404-0302	20/222	5/69	0,80 (0,29-2,22)	5/49			
0411-0302	23/214	10/67	1,39 (0,63-3,06)	9/47			
0411-0402	4/193	5/62	<u>3,89 (1,01-14,94)</u>	5/49	<u>4,92 (1,27-19,02)</u>	5/41	<u>5,88 (1,51-22,86)</u>
0701-0201/02	45/193	19/64	1,27 (0,69-2,33)	12/53			
0701-03032	4/222	2/70	1,59 (0,28-8,84)	1/56			
0901-0201/02	2/190	0/65	IND	0/54			
09012-03032	10/264	1/89	0,30 (0,04-2,35)	1/69			

^a OR e IC 95% ajustados por idade e etnia (mtDNA) foram estimados por regressão logística não condicional.

* n= Número de indivíduos portadores do haplótipo/número indivíduos não portadores do haplótipo.

Tabela 16. Razões de chances (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC) para CCU de acordo com os haplótipos HLA-DRB1-DQB1

Haplótipos	Controles		CCU e NIC III			CCU		CCU	
	*n=283	*n=94	Bruta OR (95% IC)	Ajustada ^a OR (95% IC)	*n=73	Ajustada ^a OR (95% IC)	*n=62	HPV-16	
								Ajustada ^a OR (95% IC)	
DR1									
01-05	51/190	8/76	0,39 (0,18-0,87)	0,41 (0,15-1,13)	5/60	0,21 (0,05-0,91)	4/50	0,19 (0,03-1,14)	
0101-0501	25/207	4/80	0,41 (0,14-1,23)	0,42 (0,11-1,59)	3/64	0,33 (0,06-1,70)	2/54	0,29 (0,04-2,29)	
0102-0501	22/208	3/81	0,35 (0,10-1,20)	0,30 (0,05-1,83)	2/65	0,11 (0,01-1,82)	2/55	IND	
1001-0501	13/209	4/81	0,79 (0,25-2,51)		2/65				
DR8									
08-0301	7/148	4/35	2,42 (0,67-8,71)	1,57 (0,26-9,46)	3/27	1,58 (0,19-13,27)	3/23	1,95 (0,21-17,61)	
08-0402	50/208	16/64	1,04 (0,56-1,95)	1,39 (0,63-3,07)	10/51	0,90 (0,32-2,54)	9/43	0,84 (0,27-2,64)	
0801-0402	8/221	1/69	0,40 (0,05-3,26)		1/55				
0802-0402	12/217	4/67	1,08 (0,34-3,46)		3/53				
08041-0301	4/173	4/41	4,22 (1,01-17,58)	3,32 (0,44-25,28)	3/32	3,63 (0,34-38,41)	3/27	4,55 (0,40-52,12)	
08041-0402	25/217	9/66	1,18 (0,53-2,66)		4/53				
DR51									
15-0602	24/246	17/73	2,39 (1,22-4,68)	3,99 (1,73-9,18)	13/58	4,27 (1,69-10,77)	11/50	3,68 (1,38-9,84)	
1501-0602	10/249	14/73	4,78 (2,04-11,20)	9,35 (3,31-26,39)	11/58	8,89 (2,82-28,03)	10/50	8,54 (2,60-28,02)	
1503-0602	14/246	3/73	0,72 (0,20-2,58)	0,84 (0,17-4,17)	2/58	1,27 (0,24-6,61)	1/50	IND	
1601-0502	9/271	1/91	0,33 (0,04-2,65)	1,19 (0,14-10,15)	1/70	1,98 (0,22-17,46)	1/59	2,64 (0,29-23,81)	
1602-0301	14/189	11/47	3,16 (1,35-7,41)	3,29 (1,06-10,20)	9/35	3,26 (0,87-12,23)	9/30	4,18 (1,07-16,38)	
1602-0502	3/256	2/80	2,13 (0,35-12,99)		2/61			4,08 (0,53-31,48)	

Tabela 16. (Continuação)

Haplótipos DRB1-DQB1	Controles		CCU e NIC III			CCU		CCU HPV-16	
	*n=283	*n=94	Bruta OR (95% IC)	Ajustada ^a OR (95% IC)	*n=73	Ajustada ^a OR (95% IC)	*n=62	Ajustada ^a OR (95% IC)	
DR52									
0301-0201	35/196	7/67	0,59 (0,25-1,38)	0,65 (0,24-1,75)	4/56	0,43 (0,12-1,61)	3/46	0,36 (0,08-1,23)	
0302-0402	5/220	2/69	1,28 (0,24-6,72)	0,88 (0,14-5,63)	1/55	0,68 (0,06-7,22)	1/46	0,86(0,08-9,22)	
11-0301	32/185	14/45	1,80 (0,89-3,65)	1,18 (0,49-2,83)	12/35	1,17 (0,44-3,12)	8/30	0,75 (0,23-2,44)	
11-0602	9/219	3/59	1,24 (0,33-4,72)		1/46				
1101-0301	13/186	7/45	2,23 (0,84-5,90)	1,99 (0,64-6,18)	5/35	1,66 (0,44-6,29)	4/30	1,26 (0,29-5,53)	
1101-0602	8/235	3/66	1,33 (0,34-5,17)		1/53				
1102-0301	8/193	3/47	1,54 (0,39-6,03)		3/35				
1104-0301	11/193	4/47	1,49 (0,46-4,90)		4/35				
1201-0501	8/207	0/81	IND		0/65				
13-06	44/195	5/66	0,34 (0,13-0,88)	0,45 (0,14-1,42)	5/51	0,74 (0,22-2,48)	2/45	0,53 (0,11-2,33))	
1301-0603	22/253	1/92	0,13 (0,02-0,94)	0,29 (0,04-2,29)	1/71	0,46 (0,06-3,74)	1/61	IND	
1302-0604	9/260	1/90	0,32 (0,04-2,57)	0,08 (0,00-2,21)	1/69	0,08 (0,00-4,25)	0/60	IND	
1302-0605	3/262	2/90	0,82 (0,08-8,05)		2/69				
1401-05031	5/277	2/92	1,20 (0,23-6,31)		2/71				
1402-0301	21/193	7/47	1,37 (0,55-3,41)		6/35				

Tabela 16. (Continuação)

Haplótipos DRB1-DQB1	Controles		CCU e NIC III		CCU		CCU HPV-16	
	*n=283	*n=94	Bruta OR (95% IC)	Ajustada ^a OR (95% IC)	*n=73	Ajustada ^a OR (95% IC)	*n=62	Ajustada ^a OR (95% IC)
DR53								
04-0301	4/135	9/29	10,47 (3,02-36,35)	5,36 (1,15-24,96)	6/17	3,55 (0,65-19,43)	5/14	3,46 (0,54-22,37)
04-0302	58/207	22/61	1,29 (0,73-2,27)	0,91 (0,42-1,94)	21/43	1,31 (0,57-3,00)	17/38	1,18 (0,46-2,18)
0401-0301	2/191	3/45	6,37 (1,03-39,23)	7,37 (0,58-93,15)	2/33	2,53 (0,17-37,41)	2/29	3,26 (0,54-22,37)
0401-0302	2/219	2/67	3,27 (0,45-23,65)		2/48			
0403-0302	5/222	2/70	1,27 (0,21-6,68)		2/50			
0404-0302	20/222	5/69	0,80 (0,29-2,22)		5/49			
0411-0302	23/214	10/67	1,39 (0,63-3,06)		9/47			
0411-0402	4/193	5/62	3,89 (1,01-14,94)	3,17 (0,54-18,60)	5/49	4,63 (0,72-29,99)	5/41	5,68 (0,82-39,40)
0701-0201/02	45/193	19/64	1,27 (0,69-2,33)		12/53			
0701-03032	4/222	2/70	1,59 (0,28-8,84)		1/56			
09012-03032	10/264	1/89	0,30 (0,04-2,35)		1/69			

^a OR e IC 95% ajustados por idade e etnia (mtDNA) foram estimados por regressão logística não condicional.

* n= Número de indivíduos portadores do haplótipo/número indivíduos não portadores do haplótipo.

A análise bruta revelou um risco diminuído do haplótipo DRB1*01-DQB1*05 no desenvolvimento de CCU. Após os ajustes esse efeito foi significativo somente nos casos de CCU (OR=0,21; 0,05-0,91). Para todos os alelos do grupo DRB1*01 foram obtidos valores de OR abaixo da unidade. O mesmo foi observado para os haplótipos do grupo DRB1*13 (DRB1*13-DQB1*06 e DRB1*1301-DQB1*0603) entretanto, após o ajuste, o efeito protetor não foi estatisticamente significativo (Tabelas 15 e 16).

Os haplótipos DRB1*1101-DQB1*0301, DRB1*08-DQB1*0301 e DRB1*08041-DQB1*0301 apresentaram riscos de 2,23 a 4,22. Contudo nenhum destes haplótipos foi significativamente associado ao CCU.

A análise bruta do haplótipo DRB1*04-DQB1*0301 revelou um risco de 10,47 vezes de desenvolvimento de CCU. Após o ajuste, este risco diminuiu pela metade, no entanto, ainda foi significativo na análise do grupo total de casos (OR=5,35; IC: 1,15-24,96). Este risco tendeu a cair nos casos que continham somente CCU e/ou CCU HPV-16 positivos, perdendo o poder estatístico. Resultados parecidos foram observados para o haplótipo DRB1*0401-DQB1*0301. Ao contrário, o haplótipo DRB1*0411-DQB1*0402 apresentou riscos elevados que variaram de 3,89 (IC: 1,01-14,94) na análise bruta a 5,68 (IC: 0,82-39,40) na análise ajustada, contudo não foi significativo (Tabela 16).

Uma forte associação do haplótipo DRB1*1602-DQB1*0301 com o CCU foi observada (OR=3,29; IC: 1,06-10,20) na amostra total de casos. O risco foi maior no grupo de casos HPV-16 positivos (OR=4,08; IC: 0,53-31,48). Esta associação foi perdida quando amostras com diagnóstico de CIN III foram retiradas da análise.

Um forte risco de desenvolvimento de CCU foi associado aos haplótipos envolvendo o grupo DRB1*15 (OR=2,39; IC: 1,22-4,68). A magnitude da associação entre o haplótipo DRB1*1501-DQB1*0602 e CCU dobrou após o ajuste por idade e etnia, aumentando de 4,78 (IC: 2,04-11,20) para 9,35 (IC: 3,31-26,39) no grupo total de casos. Este risco permaneceu

elevado nos grupos de mulheres só com CCU (OR=8,89; IC: 2,82-28,03) e/ou CCU HPV-16 positivos (OR=8,54; IC: 2,60-28,02).

A distribuição dos alelos e haplótipos HLA também foi avaliada quanto ao status de infecção para HPV nos controles. As Tabelas 17 e 18 mostram a distribuição dos alelos de DRB1 e DQB1 respectivamente.

Tabela 17. Razões de chances (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC) para positividade de HPV de acordo com HLA-DQB1.

DQB1 Alelos	Controles HPV Negativos		Controles HPV Positivo		Controles HPV-16		
	*n=190	*n=97	Bruta OR (95% IC)	Ajustada ^a OR (95% IC)	*n=16	Bruta OR (95% IC)	Ajustada ^a OR (95% IC)
*02	55/135	32/65	1,21 (0,71-2,05)		4/12	0,82 (0,25-2,65)	
*03	112/78	54/43	0,87 (0,53-1,43)		9/7	0,89 (0,32-2,51)	
*0301	63/127	30/67	0,90 (0,53-1,53)		6/10	1,21 (0,42-3,49)	
*0302	40/150	23/74	1,17 (0,65-2,10)		2/14	0,54 (0,12-2,45)	
*03032	12/178	4/93	0,64 (0,20-2,03)		0/16	IND	
*04	51/139	14/83	0,46 (0,24-0,88)	0,41 (0,21-0,80)	1/15	0,18 (0,02-1,41)	
*0402	50/140	14/83	0,47 (0,24-0,91)	0,42 (0,21-0,82)	1/15	0,19 (0,00-1,28)	
*05	54/136	40/57	1,77 (1,06-2,95)	1,80 (1,07-3,04)	7/9	1,96 (0,69-5,52)	
*0501	44/146	31/66	1,56 (0,90-2,68)	1,59 (0,92-2,77)	3/13	0,76 (0,21-2,81)	
*0502	8/182	5/92	1,23 (0,39-3,88)		3/13	5,25 (1,24-22,19)	5,29 (1,20-23,29)
*0503	4/186	2/95	0,98 (0,17-5,44)		1/15	3,10 (0,32-29,52)	
*06	50/140	26/71	1,03 (0,59-1,78)		5/11	1,27 (0,42-3,84)	

^a OR e IC 95% ajustados por idade e etnia (mtDNA) foram estimados por regressão logística não condicional.

* n= Número de indivíduos portadores/número indivíduos não portadores do alelo.

Tabela 18. Razões de chances (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC) para positividade de HPV de acordo com HLA-DRB1.

DRB1 alelos	Controles				Controles				Controles	
	HPV Negativo	HPV Positivo			HPV-16			Ajustada ^a OR (95% IC)	Bruta OR (95% IC)	Ajustada ^a OR (95% IC)
		*n=187	*n=96	Bruta OR (95% IC)	*n=16	Bruta OR (95% IC)				
*01	32/155	20/76	1,28 (0,68-2,37)		2/14	0,69 (0,15-3,19)				
*03	31/156	14/82	0,86 (0,43-1,71)		2/14	0,72 (0,16-3,32)				
*04	48/139	26/70	1,07 (0,62-1,88)		4/12	0,96 (0,30-3,14)				
*07	29/158	22/74	1,62 (0,87-3,01)		3/13	1,26 (0,34-4,69)				
*08	48/139	15/81	0,54 (0,28-1,02)	0,49 (0,25-0,95)	1/15	0,19 (0,03-1,50)			0,18 (0,02-1,44)	
*0801	7/180	1/95	0,27 (0,03-2,23)		0/16	IND				
*0802	11/176	5/91	0,88 (0,29-2,61)		0/16	IND				
*0804	25/162	4/92	0,28 (0,09-0,83)	0,26 (0,09-0,79)	0/16	IND				
*09	11/176	2/94	0,34 (0,07-1,57)		0/16	IND				
*10	5/182	8/88	3,31 (1,05-10,41)	3,86 (1,18-12,62)	2/14	5,20 (0,92-29,26)			8,03 (1,19-53,97)	
*11	30/157	11/85	0,68 (0,32-1,42)		1/15	0,35 (0,04-2,74)				
*12	8/179	3/93	0,72 (0,19-2,78)		0/16	0,96 (0,93-0,99)				
*13	39/148	24/72	1,26 (0,71-2,26)		4/12	1,26 (0,39-4,14)				
*14	19/168	11/85	1,14 (0,52-2,51)		1/15	0,59 (0,07-4,71)				
*15	16/171	11/85	1,38 (0,62-3,11)	1,39 (0,61-3,16)	5/11	4,86 (1,50-15,73)			4,41 (1,33-14,67)	
*1501	7/180	4/92	1,12 (0,32-3,92)	1,13 (0,32-4,00)	2/14	3,67 (0,69-19,37)			3,59 (0,66-19,64)	
*1503	10/177	7/89	1,39 (0,51-3,78)	1,37 (0,50-3,79)	3/13	4,08 (1,00-16,69)			3,56 (0,83-15,22)	
*16	17/170	10/86	1,16 (0,51-2,65)	1,08 (0,45-2,58)	4/12	3,33 (0,97-11,48)			3,42 (0,96-12,16)	
*1601	6/181	3/93	0,97 (0,23-3,98)	0,85 (0,20-3,55)	2/14	4,31 (0,79-23,36)			4,37 (0,75-25,26)	
*1602	11/176	7/89	1,26 (0,47-3,36)	1,24 (0,45-2,58)	2/14	2,28 (0,46-11,34)			2,42 (0,46-12,72)	

^a OR e IC 95% ajustados por idade e etnia (mtDNA) foram estimados por regressão logística não condicional

* n= Número de indivíduos portadores/número indivíduos não portadores do alelo.

A análise de DQB1 revelou um forte efeito protetor à infecção por todos os tipos de HPV em mulheres portadoras do grupo DQB1*04, especialmente portadoras do alelo DQB1*0402 (OR=0,42; IC: 0,21-0,82). Este efeito não foi verificado quando somente os controles HPV-16 positivos foram analisados (Tabela 17).

Uma associação positiva foi observada para portadoras do grupo DQB1*05 (OR=1,80; IC: 1,07-3,04) positivas para qualquer tipo de HPV. Entretanto, esta associação não foi observada quando somente mulheres HPV-16 positivas foram analisadas. O efeito maior desta associação foi devido ao alelo DQB1*0501 (OR=1,59; IC: 0,92-2,77). Por outro lado, o alelo DQB1*0502 apresentou uma forte associação com o desenvolvimento de CCU em mulheres HPV-16 positivas (OR=5,29; IC: 1,20-23,29).

O grupo DRB1*08 apresentou uma associação negativa à infecção por todos os tipos de HPV (OR=0,49; IC: 0,25-0,95). Todos os alelos deste grupo apresentaram OR abaixo da unidade, com o alelo DRB1*0804 apresentado uma forte associação negativa (OR=0,26; IC: 0,09-0,79). Alelos de DRB1*08 encontram-se em desequilíbrio de ligação com alelos do grupo DQB1*04.

O grupo DRB1*10 foi fortemente associado com o status de infecção para todos os tipos de HPV (OR=3,86; IC: 1,18-12,62). A magnitude desta associação dobrou nos casos HPV-16 positivos (OR=8,03; IC: 1,19-53,97). Uma tendência de associação positiva foi encontrada em portadoras do grupo DRB1*16 positivas para HPV-16 (OR=3,42; IC: 0,96-12,16). A Tabela 19 mostra a distribuição dos haplótipos DRB1-DQB1 entre os controles positivos para qualquer tipo de HPV e os controles HPV-16 positivos.

Tabela 19. Razões de chances (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC) para positividade de HPV de acordo os haplótipos HLA-DRB1-DQB1.

Haplótipos	Controles HPV Negativo		Controles HPV Positivo		Controles HPV-16	
	*n=187	*n=96	Bruta OR (95% IC)	Ajustada ^a OR (95% IC)	*n=16	Bruta OR (95% IC)
DR8-DQ7	7/94	0/54	IND		0/9	IND
DR8-DQ4	39/130	11/78	0,47 (0,23-0,97)	0,41 (0,19-0,87)	0/14	IND (p=0,04)
DR10-DQ5	5/143	8/66	3,47 (1,09-11,0)	4,09 (1,24-13,46)	2/13	4,40 (0,78-24,95)
DR15-DQ6	14/164	10/82	1,43 (0,61-3,35)	1,45 (0,61-3,44)	5/11	5,32 (1,25-19,52)
1501-0602	6/166	4/83	1,33 (0,37-4,85)	1,36 (0,37-5,00)	2/11	5,03 (0,91-27,89)
1503-0602	8/164	6/82	1,50 (0,5-4,47)	1,51 (0,50-4,59)	3/11	5,59 (1,30-24,09)
1601-0502	6/180	3/91	0,99 (0,24-4,05)	0,87 (0,21-3,64)	2/13	4,62 (0,41-29,03)
1602-0301	9/124	5/65	1,06 (0,34-3,29)	0,96 (0,27-3,33)	1/9	1,56 (0,14-16,95)
						1,70 (0,19-15,55)

^a OR e IC 95% ajustados por idade e etnia (mtDNA) foram estimados por regressão logística não condicional.

* n= Número de indivíduos portadores do haplótipo/número indivíduos não portadores do haplótipo.

A análise conjunta dos genes DRB1 e DQB1 nos controles revelou uma associação negativa do haplótipo DRB1*08-DQB1*04 com a positividade para HPV, sendo independente do tipo de HPV (Tabela 19). Vale ressaltar que este haplótipo foi ausente entre as pacientes normais HPV-16 positivas ($p=0,04$).

Forte associação positiva foi observada entre o haplótipo DRB1*10-DQB1*05 e o risco de infecção por qualquer tipo de HPV (OR=4,09; IC: 1,24-13,46), este risco permaneceu entre mulheres HPV-16 positivas mas não foi significativo (OR=4,40; IC: 0,78-24,95).

Foi observada uma alta susceptibilidade à infecção por HPV-16 em mulheres portadoras do haplótipo DRB1*15-DQB1*06 (OR=5,32; IC: 1,25; 19,52), principalmente do haplótipo DRB1*1503-DQB1*0602 (OR=5,59; IC: 1,30; 24,09). Neste grupo de amostra, DRB1*1501-DQB1*0602 apresentou uma OR de 5,59 mas não foi estatisticamente significativa (IC: 0,91-27,89). O mesmo efeito foi observado para o haplótipo DRB1*1601-DQB1*0502 (OR=12,37; IC: 0,90-170,7).

Neste estudo, o fator idade foi um importante fator de confusão. Desta forma, foi realizada uma análise estratificada por idade em três categorias: ≤ 34 , 35-44 e ≥ 45 anos de idade. Os resultados desta análise encontram-se na Tabela 20.

Tabela 20. Razões de chances (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC) para CCU de acordo com HLA-DQB1 e DRB1.

Alelos	Idade ≤ 34				Idade entre 35-44				Idade ≥ 45			
	Controles n=98 +/-	Casos n=16 +/-	Ajustada ^a OR (95%IC)	Controles n=168 +/-	Casos n=20 +/-	Ajustada ^a OR (95%IC)	Controles n=14 +/-	Casos n=58 +/-	Ajustada ^a OR (95%IC)	Controles n=14 +/-	Casos n=58 +/-	Ajustada ^a OR (95%IC)
DQB1												
*03	50/48	12/4	3,33 (0,91-11,57)	99/69	12/8	0,94 (0,36-2,46)	12/2	43/15	0,46 (0,09-2,39)			
*0301	26/72	8/8	3,15 (1,03-9,63)	57/111	9/11	1,57 (0,61-5,97)	8/6	32/26	0,86 (0,25-2,99)			
*05	35/63	4/12	0,58 (0,17-1,97)	57/111	4/16	0,50 (0,16-1,58)	2/12	8/50	0,95 (0,17-5,39)			
*0501	30/68	3/13	0,47 (0,12-1,83)	44/124	3/17	0,53 (0,15-1,91)	1/13	6/52	1,82 (0,19-17,9)			
*0602	11/87	7/9	6,06 (1,82-20,21)	23/145	6/14	2,87 (0,98-8,38)	0/14	8/50	IND			
*0603	9/89	0/16	IND	15/153	1/19	0,69 (0,08-5,70)	0/14	0/58	IND			
DRB1												
*01	19/77	1/15	0,22 (0,03-1,83)	31/137	3/17	0,81 (0,22-2,97)	2/11	4/53	0,50 (0,07-3,34)			
*04	22/74	4/12	1,24 (0,35-4,35)	44/124	6/14	1,08 (0,38-3,01)	6/7	21/36	0,74 (0,20-2,60)			
*0401	2/94	3/13	11,59 (1,68-79,86)	1/167	0/20	IND	2/11	2/55				
*13	18/78	2/14	0,49 (0,10-2,41)	42/126	3/17	0,51 (0,14-1,86)	1/12	4/53	0,61 (0,06-6,39)			
*1301	12/84	0/16	IND	16/152	1/19	0,58 (0,07-4,71)	0/13	1/56	IND			
*1302	2/94	1/15	2,69 (0,22-33,08)	18/150	1/19	0,40 (0,05-3,19)	1/12	2/55	0,30 (0,02-3,72)			
*15	8/88	7/9	8,77 (2,47-31,16)	19/149	4/16	2,27 (0,66-7,81)	0/13	6/51	IND			
*1501	4/92	6/10	13,09 (3,05-56,12)	7/161	4/16	5,75 (1,48-22,36)	0/13	4/53	IND			
*16	10/86	3/13	2,06 (0,48-8,74)	15/153	3/17	1,71 (0,44-6,62)	0/13	8/49	IND			
*1602	6/90	2/14	2,00 (0,36-11,78)	10/158	3/17	2,58 (0,62-10,70)	0/13	8/49	IND			

Análise estratificada por idade.

^a OR e IC 95% ajustados por idade e etnia (mtDNA) foram estimados por regressão logística não condicional.

+/- = Número de indivíduos portadores/número indivíduos não portadores do alelo.

Esta análise demonstrou dados bastante informativos nos grupos de mulheres com idade ≤ 34 anos e no grupo com idade entre 35-44 anos. Fortes associações positivas envolvendo os alelos DQB1*0301, DQB1*0602, DRB1*0401 e DR*1501 foram encontradas. Foi observado um risco 3,15 vezes maior de desenvolvimento de CCU em portadoras do alelo DQB1*0301 (IC: 1,03-9,63) com idade menor que 34 anos. Este risco foi diluído nas análises envolvendo mulheres mais velhas (Tabela 19). Já o alelo DQB1 *0602 foi associado a um risco duas vezes maior (OR=6,06; IC: 1,82-20,21) neste grupo de amostras. Este alelo também apresentou uma tendência de associação positiva no grupo de mulheres com idade entre 35-44 anos, entretanto, este risco foi quase 3 vezes menor (2,87; IC: 0,98-8,38).

A magnitude da associação entre pacientes portadoras do alelo DRB1*0401 com o CCU foi de 11,59 (IC: 1,68-79,86). Devido ao pequeno número de amostras portando este alelo, não foi possível realizar análises no grupo composto por mulheres com idade maior que 35 anos. Por outro lado, o alelo DRB1*1501 apresentou um forte risco de infecção tanto no grupo de mulheres com idade ≤ 34 anos (OR=13,09; IC: 3,05-56,12) quanto no grupo com idade entre 35-44 anos (OR=5,75; IC: 1,48-22,36), apesar do risco ter diminuído pela metade.

Outra análise foi realizada, desta vez estratificando os grupos de amostras em dois grupos de idade: idade <40 e idade >40 anos (Tabela 21).

Tabela 21. Razões de chances (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC) para CCU de acordo com HLA-DQB1 e DRB1.

Alelos	Idade ≤ 40			Idade > 40		
	Controles n=208 +/-	Casos n=27 +/-	Ajustada ^a OR (95%IC)	Controles n=72 +/-	Casos n=67 +/-	Ajustada ^a OR (95%IC)
DQB1						
*03	118/90	17/10	1.30 (0.56-3.00)	43/29	50/17	1.81 (0.86-3.79)
*0301	65/143	13/14	2.16 (0.95-4.92)	26/46	36/31	1.94 (0.97-3.87)
*05	74/134	8/19	0.75 (0.31-1.81)	20/52	8/59	<u>0.39 (0.15-0.97)</u>
*0501	660/148	6/21	0.68 (0.26-1.77)	15/57	6/61	0.43 (0.15-1.21)
*0602	25/183	8/19	<u>3.04 (1.19-7.78)</u>	9/63	13/54	1.83 (0.70-4.76)
*0603	18/190	1/26	0.41 (0.05-3.29)	6/66	0/67	<u>IND (p=0.017)</u>
DRB1						
*01	37/169	4/23	0.77 (0.25-2.37)	15/56	4/62	<u>0.25 (0.08-0.81)</u>
*04	54/152	6/21	0.80 (0.31-2.12)	18/53	25/41	1.73 (0.83-3.61)
*0401	3/203	3/24	<u>8.62 (1.61-46.15)</u>	2/69	2/64	1.04 (0.14-7.67)
*13	48/158	5/22	0.67 (0.24-1.90)	13/58	4/62	<u>0.28 (0.08-0.94)</u>
*1301	22/184	1/26	0.27 (0.03-2.16)	6/65	1/65	0.19 (0.02-1.65)
*1302	14/192	2/25	1.05 (0.22-4.96)	7/64	2/64	0.26 (0.05-1.31)
*15	18/188	8/19	<u>4.50 (1.68-12.07)</u>	9/62	9/57	1.17 (0.42-3.26)
*1501	8/198	7/20	<u>8.35 (2.67-26.13)</u>	3/68	7/59	2.58 (0.63-10.49)
*16	22/184	6/21	2.26 (0.81-6.26)	3/68	8/58	2.96 (0.74-11.88)
*1602	13/193	5/22	2.94 (0.94-9.22)	3/68	8/58	2.96 (0.74-11.88)

Análise estratificada por idade.

^a OR e IC 95% ajustados por idade e etnia (mtDNA) foram estimados por regressão logística não condicional.

+/- = Número de indivíduos portadores/número indivíduos não portadores do alelo.

A análise estratificada por idade dividindo os casos em dois grupos (idade ≤ 40 e idade > 40 anos) revelou tanto associações positivas quanto associações negativas, algumas delas não foram observadas anteriormente.

Com exceção de DQB1*0301, no grupo de mulheres com idade ≤ 40 anos foram encontradas as mesmas associações vistas na análise incluindo mulheres com idade ≤ 35 anos. Sendo observados riscos positivos para os alelos DQB1*0602, DRB1*0401, DRB1*1501 (Tabela 21). Entretanto, apesar dos riscos permanecerem elevados, houve uma diminuição nos valores de OR.

Um efeito protetor foi observado envolvendo os grupos DRB1*01 (OR=0,25; IC: 0,08-0,81) e DRB1*13 (OR=0,28; IC: 0,08-0,94). O alelo DQB1*0501 está e em desequilíbrio de ligação com alelos do grupo DRB1*01. E neste grupo de amostras foi encontrada uma associação negativa do grupo DQB1*05 (OR=0,39; IC: 0,15-0,97). Já os alelos do grupo DRB1*13 estão ligados a alelos do grupo DQB1*06, principalmente o alelo DQB1*0603. Este por sua vez não foi encontrado no grupo de mulheres com idade > 40 anos ($p=0,017$); contudo, foi observada uma baixa frequência deste alelo nos controles (9,1%).

3.4.1 Análise dos Genes HLA-DQB1 e HLA-DRB1 e as Variantes Moleculares de HPV-

16

Foram também investigadas as associações entre genes HLA em pacientes de portados das variantes moleculares de HPV-16. A comparação entre variantes de HPV-16 nos grupos de casos e controles não foi possível, devido ao pequeno número de mulheres HPV-16 positivas (n=16) no grupo controle. Assim, os dados aqui apresentados resultam da comparação da distribuição dos grupos HLA entre pacientes com CCU portadoras de variantes de HPV-16 e controles. Foram realizadas análises agrupando as amostras de acordo com o classificação filogenética das variantes (E, AA) ou de acordo com a presença da substituição na posição nucleotídica 350 do gene E6 de HPV-16 (350T→G). As variantes mais freqüentes também foram analisadas individualmente (B2, B12 e protótipo). As Tabelas 22-26 mostram a distribuição das variantes da LCR de HPV-16 nos casos de acordo com HLA-DRB1 e DQB1.

Tabela 22. Razões de chances (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC) para CC positivos para variantes AA de acordo com HLA-DRb1 e DQB1.

HLA	Casos AA Positivos	Controles		
	*n=39	*n=283	Bruta OR (95% IC)	Ajustada ^a OR (95% IC)
DRB1				
*01	3/36	52/231	0,37 (0,11-1,25)	0.20 (0.03-1.52)
*03	6/33	45/238	0,96 (0,38-2,43)	
*0302	3/36	6/277	3.85 (0.92-16.06)	3.09 (0.61-15.66)
*04	12/27	74/209	1,25 (0,61-2,60)	
*0411	6/33	33/250	1.38 (0.54-3.53)	
*07	12/27	51/232	2,02 (0,96-4,26)	1.05 (0.37-2.92)
*08	6/33	63/220	0,63 (0,25-1,58)	
*09	1/38	13/270	0,55 (0,07-4,30)	
*10	2/37	13/270	1,12 (0,24-5,17)	
*11	6/33	41/242	1,07 (0,42-2,72)	
*12	0/39	11/272	IND	
*13	1/38	63/220	<u>0.09 (0.01-0.68)</u>	0.18 (0.02-1.44)
*1301	0/39	29/254	IND	
*1302	0/39	21/262	IND	
*14	7/32	30/253	1,84 (0,75-4,54)	
*15	7/32	27/256	2,07 (0,84-5,15)	2.02 (0.65-6.28)
*1501	6/33	11/272	<u>4.50 (1.56-12.95)</u>	<u>5.09 (1.39-18.63)</u>
*16	9/30	27/256	<u>2.84 (1.22-6.61)</u>	<u>5.86 (1.88-18.31)</u>
*1602	8/31	18/265	<u>3.80 (1.53-9.46)</u>	<u>5.98 (1.74-20.48)</u>
DQB1				
	n=40	n=287		
*02	15/25	87/200	1,38 (0,69-2,74)	
*03	27/13	166/121	1.51 (0.75-3.05)	1.27 (0.52-3.12)
*04	11/29	65/222	1.30 (0.61-2.73)	
*05	9/31	94/193	0,60 (0,27-1,30)	0.78 (0.28-2.13)
*0501	5/35	75/212	0.40 (0.15-1.07)	0.44 (0.12-1.65)
*06	8/32	76/211	0,69 (0,31-1,57)	
*0602	8/32	35/252	1.80 (0.77-4.22)	2.30 (0.80-6.65)
*0603	0/40	24/263	p=0.056	
*07	19/21	93/194	1,89 (0,97-3,68)	1.58 (0.67-3.73)
*08	11/29	63/224	1,35 (0,64-2,85)	
*09	1/39	16/271	0,43 (0,06-3,37)	

^a OR e IC 95% ajustados por idade e etnia (mtDNA) foram estimados por regressão logística não condicional.

* n= Número de indivíduos portadores/número indivíduos não portadores do alelo.

Tabela 23. Razões de chances (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC) para CC positivos para variantes B-2 (ramo AA) de acordo com HLA-DRB1 e DQB1.

HLA	Casos B2	Controles		
	Positivos *n=36	*n=283	Bruta OR (95% IC)	Ajustada ^a OR (95% IC)
DRB1				
*01	3/33	52/231	0,40 (0.12-1,37)	0.23 (0.03-1.78)
*03	5/31	45/238	0,85 (0,32-2,31)	
*0302	2/34	6/277	2.72 (0.53-13.99)	0.91 (0.30-2.74)
*04	11/25	74/209	1,24 (0,58-2,65)	
*0411	6/30	33/250	1.52 (0.59-3.91)	
*07	11/25	51/232	2,00 (0,93-4,33)	
*08	5/31	63/220	0,56 (0,21-1,51)	
*09	1/35	13/270	0,59 (0,07-4,67)	
*10	2/34	13/270	1,22 (0,26-5,65)	
*11	5/31	41/242	0,95 (0,35-2,59)	
*12	0/36	11/272	IND	
*13	1/35	63/220	<u>0.10 (0.01-0.74)</u>	0.20 (0.03-1.61)
*1301	0/36	29/254	IND	
*1302	0/36	21/262	IND	
*14	6/30	30/253	1,69 (0,65-4,38)	2.32 (0.73-7.35)
*15	7/29	27/256	<u>2.29 (0.92-5.72)</u>	
*1501	6/30	11/272	<u>4.95 (1.71-14.33)</u>	
*16	9/27	27/256	<u>3.16 (1.35-7.41)</u>	
*1602	8/28	18/265	<u>4.21 (1.68-10.55)</u>	
DQB1				
	n=37	n=287		
*02	14/23	87/200	1,40 (0,69-2,85)	0.51 (0.13-1.96)
*03	25/12	166/121	1,52 (0,73-3,14)	
*04	9/28	65/222	1,10 (0,49-2,44)	
*05	9/28	94/193	0,66 (0,30-1,45)	
*0501	5/32	75/212	0.44 (0.17-1.18)	2.07 (0.66-6.46)
*06	7/30	76/211	0,65 (0,27-1,54)	
*0602	7/30	35/252	1.68 (0.69-4.11)	
*0603	0/37	24/263	IND	
*07	17/20	93/194	1,77 (0,89-3,54)	1.44 (0.58-3.59)
*08	11/26	63/224	1,50 (0,70-3,21)	
*09	1/36	16/271	0,47 (0,06-3,65)	

^a OR e IC 95% ajustados por idade e etnia (mtDNA) foram estimados por regressão logística não condicional.

* n= Número de indivíduos portadores/número indivíduos não portadores do alelo.

Tabela 24. Razões de chances (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC) para CC positivos para variantes do ramo E de acordo com HLA-DRB1 e DQB1.

HLA	Casos E	Controles		
	Positivos *n=39	*n=283	Bruta OR (95% IC)	Ajustada ^a OR (95% IC)
DRB1				
*01	3/36	52/231	0,37 (0,11-1,25)	0.70 (0.19-2.52)
*03	0/39	45/238	<u>IND (p=0.015)</u>	
*04	13/26	74/209	1,41 (0.69-2,89)	
*0401	2/37	5/278	3.01 (0.56-16.05)	
*0411	7/32	33/250	1.66 (0.68-4.05)	2.77 (0.89-8.61)
*0701	9/30	51/232	1,36 (0,61-3,05)	
*08	12/27	63/220	1,55 (0,74-3,24)	
*0804	8/31	29/254	2.26 (0.95-5.38)	
*09012	1/38	13/270	0,55 (0,07-4,30)	0.47 (0.13-1.69)
*1001	3/36	13/270	1,73 (0,47-6,37)	
*11	6/33	41/242	1,07 (0,42-2,72)	
*1201	0/39	11/272	IND	
*13	4/35	63/220	0,40 (0,14-1,16)	0.47 (0.06-3.80)
*1301	1/38	29/254	0.23 (0.03-1.74)	
*1302	2/37	21/262	0.67 (0.15-2.99)	
*14	3/36	30/253	0,70 (0,20-2,42)	
*15	7/32	27/256	2,07 (0,83-5,15)	2.85 (0.99-8.69)
*1501	6/33	11/272	<u>4.50 (1.56-12.95)</u>	
*16	6/33	27/256	1,72 (0,66-4,48)	
*1602	6/33	18/265	2.68 (0.99-7.22)	
DQ				
	n=39	n=287		
*0201/02	8/31	87/200	0,59 (0,26-1,34)	1.04 (0.43-2.52)
*03	28/11	166/121	1,85 (0,89-3,87)	
*04	12/27	65/222	1,52 (0,73-3,16)	
*05	7/32	94/193	0,45 (0,19-1,05)	
*0501	7/32	75/212	0.62 (0.26-1.46)	0.91 (0.33-2.48)
*06	11/28	76/211	1,09 (0,52-2,30)	
*0602	9/30	35/252	2.16 (0.95-4.93)	
*0603	1/38	24/263	0.29 (0.04-2.19)	
*0604	0/39	13/274	IND	0.60 (0.07-4.87)
*07	21/18	93/194	<u>2.43 (1.24-4.79)</u>	
*08	8/31	63/224	0,92 (0,40-2,09)	
*09	2/37	16/271	0,92 (0,20-4,14)	

^a OR e IC 95% ajustados por idade e etnia (mtDNA) foram estimados por regressão logística não condicional.

* n= Número de indivíduos portadores/número indivíduos não portadores do alelo.

Tabela 25. Razões de chances (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC) para CC positivos para variantes protótipo (ramo E) de acordo com HLA-DRB1 e DQB1.

HLA	Casos Protótipo Positivos	Controles		
	*n=17	*n=283	Bruta OR (95% IC)	Ajustada ^a OR (95% IC)
DRB1				
*01	3/14	52/231	0,95 (0,26-3,43)	
*03	0/17	45/238	IND	
*04	7/10	74/209	1,98 (0,72-5,38)	
*0401	0/17	5/278	IND	
*0411	3/14	33/250	1.62 (0.44-5.95)	
*0701	2/15	51/232	0,61 (0,13-2,73)	
*08	4/13	63/220	1,07 (0,34-3,41)	
*0804	3/14	29/254	1.88 (0.51-6.92)	
*09012	0/17	13/270	IND	
*1001	1/16	13/270	1,30 (0,16-10,55)	
*11	2/15	41/242	0,79 (0,17-3,57)	
*1201	0/17	11/272	IND	
*13	2/15	63/220	0,46 (0,10-2,09)	
*1301	1/16	29/254	0.55 (0.07-4.28)	
*1302	1/16	21/262	0.78 (0.10-6.17)	
*14	1/16	30/253	0,53 (0,07-4,12)	
*15	6/11	27/256	<u>5,17 (1,77-15,09)</u>	<u>4.48 (1.34-15.06)</u>
*1501	5/12	11/272	<u>10.30 (2.38-38.52))</u>	<u>9.92 (2.42-40.61)</u>
*16	3/14	27/256	2,03 (0,55-7,52)	
*1602	3/14	18/265	3.15 (0.83-11.99)	
DQB1				
	n17	n=287		
*0201/02	1/16	87/200	0,14 (0,02-1,10)	0.13 (0.02-1.09)
*03	6/11	166/121	1,33 (0,48-3,71)	
*04	6/11	65/222	1,86 (0,66-5,23)	
*05	4/13	94/193	0,63 (0,20-1,99)	
*0501	4/13	75/212	0.87 (0.28-2.75)	
*06	8/9	76/211	2,47 (0,92-6,63)	
*0602	6/11	35/252	<u>3.93 (1.37-11.29)</u>	<u>4.29 (1.28-14.32)</u>
*0603	1/16	24/263	0.68 (0.09-5.38)	
*0604	0/17	13/274	IND	
*07	8/9	93/194	1,85 (0,69-4,96)	
*08	4/13	63/224	1,09 (0,34-3,47)	
*09	0/17	16/271	IND	

^a OR e IC 95% ajustados por idade e etnia (mtDNA) foram estimados por regressão logística não condicional.

* n= Número de indivíduos portadores/número indivíduos não portadores do alelo.

Tabela 26. Razões de chances (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC) para CC positivos para variantes B-12 (ramo E) de acordo com HLA-DRB1 e DQB1.

HLA	Casos B-12 Positivos	Controles	
	*n=18	*n=283	Ajustada ^a OR (95% IC)
DRB1			
*01	0/18	52/231	IND
*03	0/18	45/238	IND
*04	5/13	74/209	1,08 (0,37-3,15)
*0411	4/14	33/250	2,16 (0,67-6,97)
*0701	5/13	51/232	1,75 (0,60-5,13)
*08	7/11	63/220	2,22 (0,83-5,97)
*09012	1/17	13/270	1,22 (0,15-9,90)
*1001	1/17	13/270	1,22 (0,15-9,90)
*11	4/14	41/242	1,69 (0,53-5,38)
*1201	0/18	11/272	IND
*13	2/16	63/220	0,44 (0,10-1,95)
*1301	0/18	29/254	IND
*1302	1/17	21/262	0,73 (0,09-5,78)
*14	2/16	30/253	1,05 (0,23-4,81)
*15	0/18	27/256	IND
*16	3/17	27/256	1,90 (0,52-6,97)
*1602	3/17	18/265	2,94 (0,78-11,11)
DQB1			
	n=18	n=287	
*0201/02	5/13	87/200	0,88 (0,31-2,56)
*03	14/4	166/121	2,55 (0,82-7,94)
*04	5/13	65/222	1,31 (0,45-3,82)
*05	2/16	94/193	0,26 (0,06-1,14)
*0501	2/16	75/212	0,35 (0,08-1,57)
*06	2/16	76/211	0,35 (0,08-1,54)
*0602	2/16	35/252	0,90 (0,20-4,08)
*0603	0/18	24/263	IND
*07	11/7	93/194	3,28 (1,23-8,73)
			1,91 (0,48-7,59)
*08	4/14	63/224	1,02 (0,32-3,19)
*09	1/17	16/271	0,99 (0,12-7,97)

^a OR e IC 95% ajustados por idade e etnia (mtDNA) foram estimados por regressão logística não condicional.

* n= Número de indivíduos portadores/número indivíduos não portadores do alelo.

A análise dos genes HLA mostrou riscos positivos de desenvolvimento de CCU para portadoras do alelo DRB1*1501 (OR=8,52; IC: 3,10-23,43) e portadoras do alelo DRB1*1602 quando positivas para HPV-16 (OR=3,13; IC: 1,16-8,45). Riscos semelhantes foram encontrados quando casos portadores das variantes de HPV-16 foram comparados. Foi observado um risco 5.09 vezes maior (IC: 1,39-18,63) de mulheres positivas para variantes do ramo filogenético AA. portadoras do alelo DRB1*1501. desenvolverem CCU. Valor de OR semelhante foi observado em portadoras do alelo de origem indígena DRB1*1602 positivas para as mesmas variantes (OR=5,98; IC:1,74-20,48) (Tabela 22). Resultados parecidos foram observados quando somente mulheres positivas para variantes B-2 (do ramo AA) foram analisadas, sendo o efeito nesta última comparação mais pronunciado tanto para DRB1*1501 (OR=5,84; IC:1,57-21,77) quanto para DRB1*1602 (OR=6,83; IC:1,95-23,98) (Tabela 23).

Nenhuma associação foi encontrada entre portadoras dos alelos de DQB1 positivas para variantes AA e o CCU.

A análise das variantes do ramo E mostrou uma tendência de associação positiva com o desenvolvimento de CCU entre pacientes portadoras do grupo DRB1*15 (OR=2,85; IC: 0,99-8,69), sendo observado um risco positivo significativo para o alelo DRB1*1501 (OR=6,77; IC: 1,91-23,91) (Tabela 24). O alelo DQB1*0602, o qual está em desequilíbrio de ligação com DRB1*1501, também apresentou o mesmo efeito em mulheres positivas para variantes do ramo E (OR=3,33 (IC: 1,24-8,91).

Mulheres com infecção por variantes protótipo (ramo E) também apresentaram um risco elevado de CCU, quando estas eram portadoras do alelo DRB1*1501 (OR=9,92; IC: 2,42-40,61). Neste grupo de mulheres com variantes protótipo, o alelo DQB1*0201 apresentou uma tendência de um efeito protetor contra o CCU (OR=0.13; IC: 0,02-1,09) (Tabela 25).

Não foram observadas associações específicas de alelos HLA com o CCU em mulheres positivas da variante B-12 (ramo E) (Tabela 26).

Assim, os maiores riscos de desenvolvimento de CCU envolvendo o alelo DRB1*1501 podem ser atribuídos às variantes do ramo E, especialmente a variante protótipo. E os maiores riscos de CCU em pacientes portadoras do alelo DRB1*1602 podem ser atribuídos às variantes AA, principalmente as variantes B-2, uma vez que esta constitui a maioria das variantes do ramo AA..

Foi sugerido anteriormente que a variante 350G do gene E6 apresenta maior capacidade de persistência do genoma viral (Londesborough *et al.*, 1996). Esta posição do gene E6 também foi analisada no presente estudo e os resultados encontram-se nas Tabelas 27 e 28.

Tabela 27. Razões de chances (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC) para CCU E6350G e E6350T positivos de acordo com HLA-DRB1.

DRB1 alelos	Controles		Casos			
	*n=283	*n=43	E6350G POSITIVOS		E6350T POSITIVOS	
			Bruta OR (95% IC)	Ajustada OR (95% IC)	Bruta OR (95% IC)	Ajustada OR (95% IC)
*01	52/231	3/40	0,33 (0,10-1,12)	0,18 (0,02-1,30)	0,59 (0,20-1,75)	
*03	45/238	5/38	0,70 (0,26-1,86)		0,16 (0,02-1,20)	
*0302	6/277	2/41	2,25 (0,44-11,54)			
*04	74/209	12/31	1,09 (0,53-2,24)		1,75 (0,83-3,67)	
*0401	5/278	2/41	2,71 (0,51-14,44)		3,48 (0,65-18,65)	
*0411	33/250	7/36	1,47 (0,61-3,58)		1,96 (0,79-4,87)	
*0701	51/232	11/32	1,56 (0,74-3,31)		0,97 (0,38-2,47)	
*08	63/220	11/32	1,20 (0,57-2,52)		0,90 (0,38-2,18)	
*09012	13/270	1/42	0,49 (0,06-3,88)		0,63 (0,08-4,97)	
*1001	13/270	1/42	0,49 (0,06-3,88)		2,01 (0,54-7,44)	
*11	41/242	9/34	1,56 (0,70-3,50)		0,37 (0,08-1,60)	
*1201	11/272	0/43	IND		IND	
*13	63/220	2/41	0,17 (0,04-0,72)	0,33 (0,07-1,49)	0,47 (0,16-1,37)	
*1301	29/254	0/43	IND		0,27 (0,04-2,01)	
*1302	21/272	1/42	0,30 (0,04-2,26)		0,38 (0,05-2,90)	
*14	30/253	7/36	1,64 (0,67-4,01)		0,81 (0,23-2,83)	
*15	27/256	7/36	1,84 (0,75-4,54)	1,82 (0,60-5,51)	2,46 (0,98-6,17)	3,84 (1,27-11,55)
*1501	11/272	6/37	4,01 (1,40-11,49)	4,40 (1,25-15,54)	5,30 (1,82-15,42)	10,87 (2,87-41,16)
*16	27/256	9/34	2,51 (1,09-5,78)	4,55 (1,53-13,49)	2,03 (0,77-5,34)	1,83 (0,48-6,97)
*1602	18/265	8/35	3,37 (1,36-8,31)	4,73 (1,45-15,46)	3,15 (1,16-8,60)	2,32 (0,58-9,37)

^a OR e IC 95% ajustados por idade e etnia (mtDNA) foram estimados por regressão logística não condicional.

* n= Número de indivíduos portadores/número indivíduos não portadores do alelo.

Tabela 28. Razões de chances (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC) para CCU 350G positivos e 350T positivos de acordo com HLA-DQB1.

DQB1 Alelos	Controles		Casos E6350G POSITIVOS		Casos E6350T POSITIVOS		
	*n=287	*n=44	E6350G POSITIVOS		*n=34	E6350T POSITIVOS	
			Bruta OR (95% IC)	Ajustada ^a OR (95% IC)		Bruta OR (95% IC)	Ajustada ^a OR (95% IC)
*0201/02	87/200	15/29	1,19 (0,61-2,33)		6/28	0,49 (0,20-1,23)	
*03	166/121	31/13	1,74 (0,87-3,46)		24/10	1,75 (0,81-3,79)	
*04	65/222	14/30	1,59 (0,80-3,18)		8/26	1,05 (0,45-2,43)	
*05	94/193	9/35	0,53 (0,24-1,14)		7/27	0,53 (0,22-1,27)	
*0501	75/212	14/30	0,36 (0,14-0,95)	0,39 (0,11-1,41)	7/27	0,73 (0,31-4,61)	
*06	76/211	10/34	0,82 (0,38-1,73)		9/25	1,00 (0,45-2,24)	
*0602	35/252	10/34	2,12 (0,36-4,66)	<u>2,66 (1,01-6,98)</u>	7/27	1,87 (0,76-461)	<u>3,56 (1,20-10,62)</u>
*0603	24/263	0/44	IND			0,33 (0,04-2,53)	
*0604	13/274	0/44	IND			IND	
*07	93/194	23/21	<u>2,28 (1,20-4,34)</u>	2,15 (0,95-4,84)	17/17	<u>2,08 (1,02-4,27)</u>	1,13 (0,44-2,93)
*08	63/224	10/34	1,05 (0,49-2,23)		10/24	1,48 (0,67-3,26)	
*09	16/271	1/43	0,39 (0,05-3,05)		2/32	1,06 (0,23-4,81)	

^a OR e IC 95% ajustados por idade e etnia (mtDNA) foram estimados por regressão logística não condicional.

* n= Número de indivíduos portadores/número indivíduos não portadores do alelo.

Associações positivas com o CCU foram encontradas envolvendo o grupo DRB1*15 e mulheres portadoras das variantes E6350T (OR=3,84; IC:1,27-11,55). Um efeito duas vezes maior foi observado para portadoras do alelo DRB1*1501, apesar da imprecisão das estimativas, como indicam as amplitudes dos intervalos de confiança (OR=10,87; IC:2,87-41,16) (Tabela 27).

Em mulheres positivas para a variante E6350G, o alelo DRB1*1501 também apresentou uma associação positiva com CCU (OR=4,40; IC:1,25-15,54). Entretanto, o risco observado foi quase três vezes menor quando comparado ao risco encontrado para mulheres portadoras das variantes E6350T (OR=10,87; IC:2,87-41,16). As pacientes positivas para as variantes E6350G e portadoras do alelo DRB1*1602 também apresentaram alta susceptibilidade ao desenvolvimento de CCU (OR=4,73; IC:1,45-15,46). Já o grupo DQ7 (*0301), o qual está em desequilíbrio de ligação com DRB1*1602, não foi associado positivamente com o CCU, após o ajuste por idade e etnia.

Um elevado risco de susceptibilidade também foi observado para portadoras do alelo DQB1*0602 (OR=3,56; IC:1,20-10,62) tanto no grupo de mulheres positivas para as variantes E6350T quanto no grupo de mulheres com variantes E6350G. Este se encontra em desequilíbrio de ligação com DRB1*1501 que também associou com CCU nos dois grupos de amostras (Tabela 28).

4. DISCUSSÃO

4.1 Estudos do tipo Caso-Controle *versus* Etnia

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 ao período e local de obtenção de amostras quanto a sua composição étnica. Para verificar se a distribuição de alelos HLA entre pacientes com CCU difere da distribuição da população livre de doença, o grupo controle utilizado para comparação com os casos foi coletado em regiões e períodos de tempo próximos dos casos de CCU.

O conhecimento da composição étnica da população envolvida em estudos de associação genética é de extrema importância, uma vez que estas associações podem ser espúrias devido à diferença na prevalência de alguns alelos, neste caso HLA, nas diferentes populações. A maioria dos estudos realiza ajustes estatísticos utilizando a cor da pele em relação a este importante fator de confusão. Entretanto, ainda assim algum erro classificatório pode ocorrer, principalmente se populações com elevado grau de mistura étnica forem consideradas. Hoggart e col. (2003) sugerem que estudos de associação genética do tipo caso-controle deveriam, pelo menos, ser verificados quanto à distância genética entre casos e controles.

Este é o primeiro trabalho que utiliza marcadores genéticos para a definição de grupo étnico em estudos que envolvem associações entre HLA e CCU. Os marcadores genéticos selecionados neste trabalho são baseados em sítios de restrição de fragmentos do mtDNA, os quais são classicamente utilizados nos estudos de definição da estrutura genética de populações humanas, tendo indicado boa diferenciação entre as populações estudadas (Horai

et al., 1993; Torroni *et al.*, 1993; Torroni *et al.* 1994; Batista-dos-Santos *et al.*, 1999). A utilização de marcadores do DNA nuclear é adequada para populações com elevada miscigenação como indicam estudos realizados na população brasileira (Zago *et al.*, 1996; Vallinoto *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 1999; Batista-dos-Santos *et al.*, 1999).

A historiografia da população de Belém mostra que a miscigenação foi característica marcante desde a sua fundação. De acordo com os registros históricos a miscigenação de ameríndios com europeus durou aproximadamente 150 anos. A partir da segunda metade do século XVIII a cidade começou a receber um significativo fluxo de africanos e nordestinos, o que durou aproximadamente 60 anos (Figueiredo, 2003).

Os dados de estimativas de mistura interétnica (de acordo com o mtDNA), da amostra total analisados para os genes HLA, demonstram que a população de Belém estudada apresenta uma maior contribuição indígena (60,2%) seguida pela contribuição africana (20,7%) e européia (19,1%). O elevado componente indígena na população de Belém sugere que a amostra estudada segue o padrão de povoamento ocorrido nesta região. Portanto, encontram-se de acordo com os registros histórico da população de Belém.

Em 1999, Rodrigues estimou a contribuição étnica da população de Belém utilizando 5 VNTR. Os resultados foram similares aos nossos, com alguma variação nas proporções (41% ameríndio, 34% europeus e 25% africanos).

As análises de contribuição étnica do presente estudo usando o DNA nuclear sugerem uma maior contribuição européia entre os controles (32% ameríndio, 45% europeu e 23% africano). Uma maior contribuição ameríndia foi encontrada nos casos (37% ameríndio, 34% europeu, 29% africano). Entretanto, apesar das diferenças nas proporções observadas, a participação de cada etnia entre casos e controles é semelhante, tanto pela análise do mtDNA quanto pela análise do DNA nuclear. Estas diferenças não foram significativas em ambas as análises ($p=0,426$ e $FST=-0,0032$, respectivamente).

Na análise do mtDNA também foi observada uma maior contribuição de africanos nos casos (25,3%) quando comparados aos controles (18,5%). O que poderia ter ocorrido devido a diferenças socioeconômicas. Os resultados do censo de 2000 mostram uma marcante diferença econômica associada à classificação cor/etnia, onde a renda mensal de pessoas definidas como negro é 60% mais baixa do que a renda de pessoas definidas como branco. Além disso, em todas as regiões do mundo o CCU apresenta uma consistente associação com o baixo nível sócio econômico (Franceschi, *et al.*, 2005), advinda da falta de acesso a programas de rastreamento da doença, os quais permitem precoce detecção e tratamento.

4.2 Associações entre HLA de classe II e CCU

O grande número de polimorfismos dos alelos HLA gera variações no sítio de reconhecimento do antígeno presente na superfície celular. Estas variações poderiam conferir susceptibilidade ou resistência às infecções por HPV e progressão neoplásica das lesões. A análise da distribuição dos alelos de DRB1 revelou uma significativa associação negativa entre o grupo DRB1*01 e CCU (OR=0,25, IC: 0,7-0,91). Este efeito foi observado em mulheres com idade maior que 40 anos. Um efeito protetor do alelo DRB1*0101 foi anteriormente descrito em mulheres da cidade de João Pessoa (PB) após o ajuste por diferentes variáveis (Maciag *et al.*, 2000).

Na análise bruta, o grupo DRB1*13 apresentou proteção moderada nos grupos contendo todos os casos ou somente CCU, mas não foi estatisticamente significativa após o ajuste por idade e etnia (OR=0,49 e OR=0,67, respectivamente). Entretanto, este grupo mostrou um efeito protetor contra o CCU em mulheres com idade maior que 40 anos. Tendências de associação foram observadas para o alelo DRB1*1302 em João Pessoa (Maciag *et al.*, 2000). Um efeito protetor significativo do grupo DRB1*13 foi observado em populações de mulheres

brancas: hispânica (Apple *et al.*, 1994; 1995), francesa (Sastre-Garau *et al.*, 1996), sueca (Sanjeevi *et al.*, 1996) e americana (Hildesheim *et al.*, 1998). Os alelos DRB1*1301 e DRB1*1302 são comuns tanto em populações africanas quanto em populações européias (Fernandez-Viña *et al.*, 1992), o que poderia explicar resultados concordantes entre diferentes populações.

Foi observada uma forte susceptibilidade de desenvolvimento de CCU em portadoras do alelo DRB1*0401 (OR=5,58; IC: 1,03-30,28). A magnitude desta associação dobrou em mulheres jovens com idade ≤ 34 anos (OR=11,59; IC: 1,68-79,86). Entretanto, na análise restrita a casos HPV-16 positivos esta associação não foi observada, provavelmente, devido à baixa frequência de DRB1*0401 em Belém. Este resultado foi contrário em mulheres brancas americanas, onde houve um risco significativo maior nos casos HPV-16 positivos comparados aos casos HPV-16 negativos (Madeleine *et al.*, 2002).

O alelo DQB1*0602, o qual está ligado a DRB1*1501, também foi associado positivamente com o CCU nos diferentes grupos de amostras. Associações deste tipo foram observadas em um estudo conduzido na Tanzânia onde a população é constituída principalmente por negros (Wank *et al.*, 1993) e em mulheres suecas (Beskow *et al.*, 2001). Em contraste, esta associação não foi observada em um estudo realizado na população de negros residentes nos Estados Unidos (Gregoire *et al.*, 1994).

Análise dos controles mostrou uma associação positiva entre a infecção por HPV e os alelos do grupo DR*15, este efeito também foi observado em João Pessoa (Maciag *et al.*, 2000). Um risco aumentado de desenvolvimento de CCU foi observado em portadoras do grupo DR15 (OR=3,32, IC: 1,48-7,44). A magnitude da associação entre o alelo DRB1*1501 para todos os casos de CCU dobrou após o ajuste por idade e etnia, aumentando de 4,33 (IC: 1,89-9,91) para 8,52 (IC: 3,10-23,43). Os riscos de susceptibilidade ao desenvolvimento de CCU observados para o grupo DRB1*15 são bem mais fortes no grupo de pacientes com idade

inferior a 40 anos. O que poderia estar correlacionado com variáveis de comportamento tais como número de parceiros e início da atividade sexual. A associação positiva entre os alelos do grupo DR15 e o CCU também foi observada em João Pessoa (OR=2,24, IC: 1,29-3,90), com um efeito pronunciado para DRB1*1503. Este alelo é prevalente em populações africanas mas não em populações européias, nas quais o alelo DRB1*1501 é mais freqüente (Moraes *et al.*, 1993). Em estudos de várias populações, maiores riscos tanto de desenvolvimento de CCU quanto de suas lesões precursoras foram atribuídos aos alelos do grupo DRB1*15.

Estas associações estão descritas entre mulheres suecas (Sanjeevi *et al.*, 1996; Beskow *et al.*, 2001), e mestiças (de origem européia e ameríndia) do Novo México (EUA), particularmente o alelo DRB1*1501 (Apple *et al.*, 1994;1995).

A maioria dos estudos de diferentes populações descreve associações positivas de DRB1*15 com o CCU, indicando que este grupo confere suscetibilidade ao CCU. Uma vez que DRB1*15 está em desequilíbrio de ligação com o alelo DQB1*0602, uma possibilidade seria que o efeito fosse atribuído ao alelo de DQB1 ou, ainda, resultaria de efeito aditivo dos 2 *loci*. Apesar do risco 2 vezes maior de DRB1*15 quando comparado a DQB1*0602, nesta amostra, não foi possível estimar o efeito de cada alelo no risco, uma vez que DRB1*15 estava em desequilíbrio de ligação absoluto com DQB1*0602. Já o alelo DQB1*0602 foi encontrado ligado a outros alelos o que poderia diminuir o efeito do mesmo no risco de doença. No entanto, em estudos anteriores foi possível observar que a contribuição de DQB1*0602 parece ser menor (revisado por Maciag & Villa, 1999; Maciag *et al.*, 2000).

Beskow e col. (2001) sugerem que o papel do haplótipo DRB1*1501-DQB1*0602 estaria relacionado à inabilidade de eliminar a infecção pelo HPV, uma vez que a freqüência de portadoras deste haplótipo é maior entre mulheres que apresentam infecções persistentes de longa duração pelo HPV quando comparadas às mulheres com infecções persistentes de curta duração. Mais recentemente, Arias-Pulido e col. (2004) demonstraram uma elevada perda de

heterozigose em pacientes portadoras do haplótipo DRB1*1501-DQB1*0602 quando comparadas a portadoras de haplótipos que conferem baixo risco de desenvolvimento de CCU. Foi sugerido também que a perda de heterozigose ocorreria em eventos iniciais do processo de carcinogênese, por ter sido observada tanto no CCU quanto em suas lesões precursoras (carcinoma *in situ*) (Arias-Pulido *et al.*, 2004).

O grupo DR16 apresentou tendência de associação positiva no grupo de amostras de CCU (OR=2,69 IC: 0,99-7,35), especialmente o alelo DRB1*1602 (OR=2,80, IC: 0,93-8,43). Esta associação foi consistente no grupo restrito a pacientes com CCU HPV-16 positivas (OR=3,87 IC: 1,23-12,14). Interessante que DRB1*1602 é um alelo tipicamente encontrado em populações ameríndias da América do Sul. Recentemente, um estudo realizado em uma população boliviana dos Andes também reportou uma associação positiva entre este alelo e risco de CCU HPV positivos (Cervantes *et al.*, 2003).

Quando foi realizada a estratificação por idade das amostras, foi possível observar um risco de susceptibilidade de desenvolvimento de CCU em mulheres com idade ≤ 34 anos portadoras de DQB1*0301 (OR=3,15; IC: 1,03-9,63). Na população de Belém o alelo DQB1*0301 foi encontrado em desequilíbrio de ligação com 7 diferentes alelos de DRB1, principalmente DRB1*1602 e DRB1*0401. Estes também foram associados positivamente ao CCU. Em um estudo realizado em outra população brasileira da cidade de João Pessoa (PB), não foi encontrada qualquer associação envolvendo o grupo DQB1*03 ou alelos individuais deste grupo (Maciag *et al.*, 2000). Naquela população DQB1*0301 foi encontrado ligado a 11 alelos de DRB1. Assim, é possível que mesmo tendo sido encontrado em alta frequência em João Pessoa, o efeito de DQB1*0301 tenha sido diluído devido ao seu desequilíbrio de ligação com um número elevado de diferentes alelos. Deve-se considerar também, as diferenças na contribuição étnica entre as duas regiões brasileiras.

Associações positivas entre alelos do grupo DQB1*03 e o risco de CCU são freqüentes em diferentes populações (David *et al.*, 1992; Vandervele *et al.*, 1993; Gregoire *et al.*, 1994; Nawa *et al.*, 1995). Em um estudo realizado na Inglaterra foi observado um maior risco de desenvolvimento de NIC entre as pacientes portadoras do alelo DQB1*0301 (Odunsi *et al.*, 1996). Entretanto, outros trabalhos não encontram associação deste grupo (Wank *et al.*, 1993). Resultados contraditórios também podem ser um indicativo de que tais populações possuem características intrínsecas nas quais interações ambientais e fatores ligados ao hospedeiro podem ser diferentes.

Apesar de DQB1*0301 não ter sido encontrado associado ao CCU individualmente nas análises envolvendo todos os casos. Este alelo foi encontrado em duas associações haplótípicas importantes envolvendo o grupo DRB1*04 e o alelo DRB1*1602. Um elevado risco foi encontrado para o haplótipo DRB1*0401-DQB1*0301 (OR=5,36; IC: 1,15-24,96), sendo restrito ao grupo com todos os casos (que inclui NIC III). Em um estudo anterior, este haplótipo também foi associado positivamente a tumores contendo o DNA de HPV-16 (Madeleine *et al.*, 2002). Associações positivas envolvendo o haplótipo DRB1*0401-DQB1*0301 foram vistas tanto em NIC I e III (Odunsi *et al.*, 1996) quanto em CCU (Cuzick *et al.*, 2000; Madeleine *et al.*, 2002). Este haplótipo é representativo de populações européias.

O haplótipo DRB1*1602-DQB1*0301 é considerado um marcador de etnia porque é encontrado unicamente em populações indígenas das Américas (Tsuneto *et al.*, 2003). Sabe-se que a população de Belém possui uma contribuição marcante de ameríndios na sua formação. Desta forma, foi possível encontrar uma associação positiva do haplótipo DRB1*1602-DQB1*0301 com CCU. Os riscos foram de 3,29 vezes (IC: 1,06-10,20) no grupo total de casos e de 4,18 no grupo restrito ao CCU HPV-16 positivo. Uma OR de 3,26 vezes foi encontrada no grupo de mulheres com CCU, no entanto esse valor não foi significativo (IC: 0,87-12,23). Esta é a única associação envolvendo este haplótipo, contudo um risco de

susceptibilidade para o alelo DRB1*1602 também foi observado em outra população de origem ameríndia (Cervantes, *et al.*, 2003). Em outros grupos étnicos, o alelo DRB1*1602 é encontrado mais frequentemente ligado a DQB1*0502. Este por sua vez foi associado ao risco de infecção por HPV-16.

Um efeito protetor foi encontrado contra a infecção por HPV em mulheres portadoras do alelo DRB1*0804. Este alelo tem sido encontrado em populações indígenas da América do Sul. O alelo DRB1*08042 tem sido identificado em ameríndios. Já o alelo DRB1*08041 é encontrado em países do sub-saara (Tsuneto *et al.*, 2003).

Em Belém, foi encontrada uma associação negativa entre o grupo DQB1*05 e o CCU em mulheres com idade maior que 40 anos. No estudo realizado em João Pessoa também foi observado um efeito protetor deste grupo (Maciag *et al.*, 2000). Odunsi e col. (1996) descreveram associações negativas de DQB1*0501 com as lesões precursoras do CCU. Este se encontra em desequilíbrio de ligação com os alelos do grupo DR1 e DR10. Em Belém, foi possível encontrar um efeito protetor do haplótipo DRB1*01-DQB1*05 no grupo de mulheres com CCU. Um efeito parecido foi observado em mulheres inglesas (Odunsi *et al.*, 1996). Além disso, foi demonstrado em outra população brasileira um efeito protetor do haplótipo DRB1*01-DQB1*0501 contra infecção persistente de HPV de longa duração (Maciag *et al.*, 2002).

A comparação dos diversos estudos de associação envolvendo genes HLA e o CCU, nem sempre é possível. Além das diferenças nos tamanhos amostrais e das técnicas empregadas na análise dos genes HLA, as frequências alélicas são distintas na população em geral das diferentes regiões geográficas. Entretanto, mesmo com essas limitações, é possível observar tendências comuns entre os diversos estudos (revisado por Souza & Villa, 2003). Muitos estudos investigaram possíveis associações entre alelos e haplótipos HLA e risco de CCU ou infecção por HPV. 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 utiliza métodos baseados em PCR. Outra fonte de variação entre os diferentes estudos pode ser o tipo de lesão analisada: alguns analisam casos de CCU invasivo, outros lesões precursoras de diferentes graus. Frente a tais limitações, muitos resultados parecem contraditórios. Deve-se considerar que o CCU é uma doença de caráter multifatorial, e que múltiplos genes podem participar no seu desenvolvimento. Características relacionadas ao vírus tais como variabilidade genética entre diferentes tipos de HPV podem também influenciar no controle da resposta imune, levando a infecções persistentes por HPV oncogênicos, o principal fator de risco para o desenvolvimento do CCU.

4.3 Variantes de HPV-16 e HLA de Classe II no desenvolvimento de CCU

As variantes moleculares de HPV-16 foram identificadas a partir da LCR viral, uma vez que esta é uma região com maior variabilidade e está sob menor pressão seletiva, o que a torna mais informativa quando comparada a regiões codificadora. A região analisada neste trabalho não interage diretamente com o complexo HLA e célula T. Entretanto, tem sido demonstrado que as substituições nucleotídicas vistas na LCR viral são compatíveis filogeneticamente com a variabilidade encontrada nas regiões codificadoras do genoma viral.

Um dos nossos objetivos foi verificar a distribuição das variantes moleculares de HPV-16 entre casos e controles. Porém, não foi possível realizar essa comparação devido ao pequeno número de mulheres com citologia normal HPV-16 positivas (n=16). Contudo, foi possível verificar a distribuição dos alelos HLA entre casos portadores de diferentes variantes de HPV-16 comparados à distribuição da população livre de doença (grupo controle).

As estratificações das amostras por ramo filogenético ou por variantes individuais revelaram associações estatisticamente significativas com o CCU envolvendo tanto as variantes do ramo AA quanto às do ramo E. Devido ao pequeno número de amostras, não foi possível realizar a estratificação de acordo com as as variantes do ramo Af.

Quando a frequência dos alelos ou grupos HLA foi contrastada entre casos HPV-16 positivos e controles, foi encontrada uma alta susceptibilidade ao CCU entre mulheres portadoras dos alelos DRB1*1501 e DRB1*1602 positivas para as variantes do ramo AA. O mesmo foi visto na análise individual das variantes B-2, o isolado do ramo AA predominante neste grupo de amostras.

Interessante que o risco de susceptibilidade ao CCU encontrado para o alelo de origem ameríndia DRB1*1602 foi restrito ao grupo de variantes AA, particularmente a variante B-2. Este trabalho é o primeiro a mostrar uma associação positiva entre DRB1*1602 e o CCU em mulheres com variantes do ramo AA. É provável que este resultado não seja encontrado em outro grupo étnico onde a variabilidade genética tanto do HLA quanto do HPV pode ser diferente.

As variantes européias não apresentaram riscos significativos de desenvolvimento de CCU envolvendo o alelo DRB1*1602. Por outro lado, foram observados riscos elevados em portadoras do alelo DRB1*1501 (OR=6,77). Na análise individual, a magnitude desta associação foi quase duas vezes maior para portadoras do HPV-16 protótipo (OR=9.92). Além disso, o risco de desenvolvimento de CCU envolvendo o alelo DRB1*1501 foi consideravelmente maior para as variantes protótipo quando comparado ao risco observado para as variantes do ramo AA (OR=5,09). Por outro lado, nenhuma associação significativa entre alelos HLA e o CCU foi observada no grupo de mulheres positivas para as variantes européias B-12. De fato, esta variante não foi encontrada em mulheres portadoras do alelo

DRB1*1501. Desta forma, podemos sugerir que o risco elevado de CCU envolvendo o alelo DRB1*1501 é atribuído principalmente ao protótipo e à variante asiático-americana B-2.

Com relação ao alelo DQB1*0201, não foi observada uma associação de risco com o CCU. Entretanto, tendências de um efeito protetor foram achadas entre mulheres portadoras de DQB1*0201 positivas para a variante protótipo (OR=0,13; IC: 0,02-1,09). Este alelo também mostrou um risco diminuído de desenvolvimento de CCU em mulheres africanas-americanas e norueguesas (Gregoire *et al.*, 1994; Helland *et al.*, 1994).

Na população analisada neste estudo, o alelo DQB1*0602 apresentou um alto risco de CCU. Esta associação foi consistente somente no grupo de mulheres portando variantes do ramo E, mais especificamente as variantes protótipo (OR=4.29). Este alelo está em desequilíbrio de ligação com DRB1*1501. Entretanto, ao contrário do observado para DRB1*1501, não foi vista uma associação positiva de DQB1*0602 com variantes do ramo AA. Provavelmente devido ao fato de DQB1*0602 estar ligado a dois outros alelos de DRB1 neste grupo de amostras, favorecendo assim estimativas imprecisas para este alelo. Um estudo anterior realizado na Tanzânia com amostras predominantemente de origem africana, mostrou uma associação positiva entre DQB1*0602 e CCU (Wank *et al.*, 1993). O mesmo efeito foi observado em mulheres suecas (Beskow *et al.*, 2001).

Tem sido sugerida a ocorrência da perda de heterozigose envolvendo o haplótipo DRB1*1501-DQB1*0602 em eventos iniciais do processo de carcinogênese (Arias-Pulido *et al.*, 2004). Por conseguinte, foi demonstrado que mulheres portadoras dos alelos DRB1*1501 e DQB1*0602 foram mais freqüentes no grupo de mulheres com infecção de longa duração, indicando que esses alelos de classe II contribuem para a inabilidade de eliminar a infecção por HPV (Beskow *et al.*, 2001). Também foi evidenciado que a variante européia 131G do gene E6 de HPV-16 altera um sítio de ligação do peptídeo com a molécula de classe I HLA-B7, podendo influenciar no reconhecimento e na resposta pelas células T citotóxicas, o que

levaria à evasão da resposta imune (Ellis *et al.*, 1995). Somados a estes achados, e de acordo com os riscos elevados de CCU envolvendo a variante asiático americana B-2 e o protótipo (ramo E) na população de Belém, podemos supor que fatores como a perda de heterozigose dos alelos DRB1*1501 e DQB1*0602 e a variabilidade do HPV poderiam contribuir para a susceptibilidade destes alelos ao desenvolvimento de CCU.

Os resultados de HLA obtidos para as variantes de HPV-16 (principalmente as variantes AA) na população de Belém são corroborados pelos dados epidemiológicos obtidos no nosso grupo, onde foi evidenciada uma maior capacidade de persistência das variantes não-européias (Villa *et al.*, 2000). Além disso, tem sido demonstrado que as variantes AA apresentam maior atividade transcricional quando comparadas às variantes do ramo E ou As. Com a variante B-12 apresentando uma atividade quase similar ao controle (Veress *et al.*, 1999; Kozuka *et al.*, 2000).

A maioria das substituições nucleotídicas nas variantes de HPV não origina substituição de aminoácidos. Supõe-se que alterações mais relevantes encontrem-se em regiões antigênicas ou em regiões que interfiram na atividade funcional das proteínas. Londesborough e col. (1996) descreveram que uma substituição na posição 350 do gene E6 (T→G) estaria associada à persistência do genoma viral. Esta substituição gera uma mudança no aminoácido 83 da proteína E6 de leucina para valina. A estratificação das amostras de acordo com as variantes da posição E6350T→G mostrou que portadoras do alelo DRB1*1501 apresentam um elevado risco de CCU tanto quando são positivas para a variante E6350T (OR=10,87) quanto quando são positivas para a variante E6350G (OR=4,40). Entretanto, o risco é quase três vezes maior em pacientes positivas para a variante E6350T. Em Belém, a substituição E6350T foi mais frequentemente encontrada nas variantes do ramo E, sendo que no caso da variante B-12 esta substituição foi encontrada em 50% dos isolados. Contudo não

foi possível estimar o risco atribuído a variante européia B-12, uma vez que nenhuma paciente positiva para esta variante portava o alelo DR*1501.

Em uma amostra de mulheres japonesas foi observado um aumento significativo nas frequências dos alelos DRB1*1501 e DQB1*0602 entre pacientes positivas para a variante E6350T (Matsumoto *et al.*, 2003). Contudo, em um estudo realizado com mulheres britânicas não foi encontrada uma correlação entre o polimorfismo E6350T→G e os genótipos de HLA ou desenvolvimento de CCU (Brady *et al.*, 1999). A análise do polimorfismo de HLA de classe I em mulheres suecas mostrou que mulheres portadoras dos alelos HLA-B*44, HLA-B*51 ou HLA-B*57 positivas para E6350G, apresentavam um risco 5 vezes maior de desenvolver CCU (Zehbe *et al.*, 2003).

Já o alelo de origem indígena DRB1*1602 foi associado significativamente somente no grupo de mulheres positivas para as variantes E6350G (OR=4,73). Interessante que esta substituição é encontrada em 95% dos isolados do ramo AA, nos quais DRB1*1602 também foi associado ao CCU.

Alguns estudos anteriores tentaram verificar uma possível correlação entre etnia e a distribuição de variantes. Em 2001, Hildesheim e col. utilizando STR (kit Profiler Plus) aplicaram um teste de distância genética entre grupos de mulheres positivas para variantes E e mulheres com variantes não-E. Os resultados não evidenciaram diferenças genéticas significativas entre os dois grupos de mulheres (Hildesheim *et al.*, 2001). Posteriormente, Xi e col. (2002) sugeriu que o risco de aquisição de variantes não-protótipo é maior em homens e mulheres não-brancos, residindo nos Estados Unidos.

Na população de Belém, nenhuma variante de HPV-16 foi mais associada a um determinado grupo étnico caracterizado por mtDNA. Todas as variantes foram encontradas em proporção similar nos três grupos étnicos que compõem a população estudada (europeu, ameríndio e africano). Entretanto, a distribuição das variantes moleculares parece seguir o

mesmo padrão da contribuição étnica observada em Belém, pois foram encontradas variantes moleculares de HPV-16 representativas dos três principais grupos étnicos humanos (variantes do ramo AA, E e Af). Resultados similares são observados em estudos realizados em populações miscigenadas tais como México (Berumen *et al.*, 2001), Costa Rica (Hildesheim *et al.*, 2001). Já os estudos realizados na Europa encontram na sua maioria variantes européias, assim como na Ásia as variantes mais freqüentes são do ramo As (Kozuka *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2002) e na África as variantes Af prevalecem (Yamada *et al.*, 1997). Vale ressaltar que as variantes européias são encontradas em considerável freqüência em diversas partes do mundo, com exceção da África. As evidências de que em cada grupo étnico ocorre o aumento da freqüência de determinadas variantes em uma dada população, aliadas ao fato de que o HPV consegue evadir a detecção do sistema imune através das moléculas HLA, são consistentes com o modelo de seleção dirigida por patógeno. Isto supostamente ocasionaria um aumento na freqüência do mesmo na população. Da mesma forma, o processo de seleção poderia favorecer o indivíduo onde seria observado um aumento na freqüência do alelo resistente naquela população (revisado por Meyer & Thomson, 2001).

Por conseguinte, os dados de HLA mostram que os maiores riscos de CCU observados para o alelo de origem européia DRB1*1501 foram atribuídos às variantes do ramo E. Assim como os maiores riscos envolvendo o alelo de origem ameríndia DRB1*1602 foram restritos às variantes do ramo AA. Além disso, um estudo realizado no Japão mostrou um elevado risco de CCU atribuído ao alelo de origem asiática DRB1*1502, em mulheres portadoras da variante asiática D25E (Matsumoto *et al.*, 2003). Estes resultados indicam a existência de uma relação entre a variabilidade genética do HPV e os diferentes grupos étnicos humanos, corroborando a teoria de que o HPV vem co-evoluindo com o seu hospedeiro por longos períodos de tempo, como o sugerido pelos estudos filogenéticos do HPV-16 e 18 (Ho *et al.*, 1993; Ong *et al.*, 1993).

O nosso estudo fornece evidências epidemiológicas de que variantes específicas de HPV-16 associadas a certos alelos de HLA classe II estão envolvidos na determinação de risco de CCU. 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) (Ellis *et al.*, 1995). Assim, o desempenho das moléculas HLA no risco de CCU está relacionado a uma melhor ou pior resposta imune na eliminação do vírus. No caso do alelo DQB1*0201 a interação resultante com as variantes protótipo (ramo E), levaria a uma resposta imune mais eficaz na eliminação do vírus, uma vez que foi observada uma tendência a um efeito protetor contra o CCU. O oposto seria esperado para as portadoras dos alelos DRB1*1501, DRB1*1602 e DQB1*0602, uma interação ineficiente com o peptídeo antigênico não eliminaria o vírus permitindo a persistência do genoma viral, um fator central no desenvolvimento de CCU (Villa *et al.*, 2000).

Por outro lado, uma alteração ou ligação ineficiente do peptídeo ao TCR poderia afetar a natureza Th1 x Th2 da resposta imune contra o peptídeo viral. Os peptídeos alterados denominados ligantes peptídicos alterados (APL), modificam a proliferação de células T CD4⁺ e o padrão de citocinas liberados por estes linfócitos (Murray, 1998). Assim como a proliferação de linfócitos T citotóxicos (CTL) pode ser regulada negativamente (Bertoletti *et al.*, 1994), e desta forma, permitir a persistência do genoma viral. Este seria mais um provável mecanismo de evasão das variantes de HPV, onde algumas delas agiriam como APL ocasionando respostas celulares pouco eficientes. A identificação de epítomos de antígenos tumorais ou peptídeos virais que conferem um efeito protetor ou susceptibilidade poderia se tornar importantes ferramentas no tratamento ou no desenho de vacinas contra o CCU.

Com o objetivo de diminuir a incidência e mortalidade mundial induzida por CCU causado por HPV, dois tipos de vacinas estão atualmente sendo desenvolvidas: vacinas profiláticas para a prevenção da infecção por HPV e vacinas terapêuticas para eliminar a

infecção e induzir a regressão das lesões causadas por HPV. As vacinas terapêuticas são necessárias para o tratamento das lesões já estabelecidas. Estas são baseadas na indução de uma resposta imune celular contra as proteínas do HPV expressas nas células tumorais. Assim, os produtos dos genes E6 e E7 são potenciais alvos antigênicos para estas vacinas de DNA (revisado por Villa, 2003). A vacina profilática é baseada na indução de anticorpos neutralizantes dirigidos contra epítomos das proteínas do capsídeo viral. A proteção contra a infecção depende da quantidade de anticorpos produzidos pelo hospedeiro, da viabilidade do sítio de infecção e da persistência de anticorpos neutralizantes por um longo período de tempo. Recentemente, foi publicado o resultado de uma vacina quadrivalente que inclui os tipos de HPV de alto risco 16 e 18, e os tipos de baixo risco 6 e 11. Juntos estes vírus são responsáveis por 70% dos CCU e das NIC, e 90% das verrugas anogenitais, respectivamente. Cerca de 277 mulheres foram vacinadas e os resultados demonstram que a vacina foi altamente imunogênica. Todas as mulheres desenvolveram altos títulos de anticorpos. Por conseguinte, a incidência de infecção persistente foi 90% menor em mulheres vacinadas comparada com mulheres vacinadas com o placebo (Villa *et al.*, 2005). A melhor caracterização das respostas imunes disparadas contra o HPV deverá servir de base para o desenvolvimento de melhores abordagens profiláticas e terapêuticas no manejo do CCU.

5. CONCLUSÃO

- 1) Nas amostras de CCU a prevalência das variantes foi de 42% de variantes do ramo E, 43,2% de isolado do ramo AA e 4,9% de variantes do ramo Af. Nas amostras normais foi observado 81% de variantes do ramo E e 18% de variantes do ramo AA.
- 2) Alta susceptibilidade ao desenvolvimento de CCU foi encontrada envolvendo os alelos DRB1*1501, DRB1*1602, DRB1*0401 e DQB1*0602. Um efeito protetor contra CCU foi observado para o grupo DRB1*01.
- 2.1) Os haplótipos DRB1*1501-DQB1*0602, DRB1*1602-DQB1*0301, DRB1*04-DQB1*0301 foram positivamente associados ao CCU. O haplótipo DRB1*01-DQB1*05 foi associado negativamente ao CCU.
- 2.2) Os alelos DRB1*1501, DRB1*0401 e DQB1*0602 foram associados ao risco de CCU em mulheres com idade menor que 40 anos. Um efeito protetor dos grupos DQB1*05, DRB1*01 e DRB1*13 foi encontrado em mulheres com idade maior que 40 anos.
- 2.3) Os alelos DRB1*0804, DQB1*0402 apresentaram efeito protetor contra positividade para HPV. O alelo DQB1*0502 e o grupo DRB1*15 e seus respectivos haplótipos, apresentaram altos riscos de susceptibilidade a infecção por HPV-16.
- 3) A composição étnica entre casos e controles não diferiu significativamente tanto pela análise do mtDNA quanto pela análise do DNA nuclear.
- 3.1) Não foi encontrada uma associação entre distribuição de variantes de HPV-16 e a origem étnica das pacientes, uma vez que a presença das variantes de HPV-16 foi similar dentro de cada grupo étnico.

- 3.2) Um risco de desenvolvimento de CCU foi observado entre as portadoras do alelo de origem ameríndia DRB1*1602 positivas para as variantes do ramo asiático-americano. O alelo de origem europeia DRB1*1501 foi mais fortemente associado ao CCU em portadoras da variante europeia protótipo.
- 3.3) Os elevados risco de CCU atribuídos aos alelos DRB*1501 e DRB1*1602 foram principalmente devido à presença da variante asiático-americana B-2 e a variante europeia protótipo.
- 3.4) A substituição nucleotídica E6350T foi associada positivamente com o CCU em portadoras do alelo DRB1*1501. Enquanto que as variantes E6350G foram associadas ao CCU tanto em portadoras do alelo DRB1*1501 quanto em portadoras do alelo DRB1*1602.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON S.; BANKIER, A.T; BARRELL, B.G.; DE BRUIJN, M.H.; COULSON, A.R.; DROUIN, J.; EPERON, I.C.; NIERLICH, D.P.; ROE, B.A.; SANGER, F.; SCHREIER, P.H.; SMITH, A.J.; STADEN, R.; YOUNG, I.G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, **290 (5806)**:457-465, 1981.
- 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.**, **87 (6)**: 427-36, 1995.
- APPLE, R.J.; ERLICH, H.A.; KLITZ, W.; MANOS, M.M.; BECKER, T.M.; WHEELER, C.H. HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. **Nature Genet.**, **6**: 157-62, 1994.
- ARMOUR, J.A.L.; ANTTINEN, T.; MAY C.A. *et al.* Minisatellites diversity support a recent African origin for modern humans. **Natur. Genet.**, **13**:154-160, 1996.
- BARBOSA, M.S. & SCHLEGEL, R. The E6 and E7 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two-stage *in vitro* transformation of human keratinocytes. **Oncogene**, **4**: 1529-32, 1989.
- BATISTA-DOS-SANTOS, E.B.; RODRIGUES, J.D.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.K.; ZAGO, M.A. Differential contribution of indigenous men and women to the formation of an urban population in the Amazon region as revealed by mtDNA and Y-DNA. **Am. J. Phys. Antropol.**, **109 (2)**: 175-80, 1999.
- BATISTA-DOS-SANTOS, S.E.; RODRIGUES, J.D.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.K.; ZAGO, M.A. Differential contribution of indigenous men and women to the formation of an urban population in the Amazon region as revealed by mtDNA and Y-DNA. **Am J Phys Anthropol.**, **109(2)**:175-180, 1999.
- BAUER, H.M.; TING, Y.; GREER, C.E.; CHAMBERS, J.C.; TASHIRO, C.J.; CHIMERA, J.; REINGOLD, A.; MANOS, M.M. Genital human papillomavirus infection in students as determined by a PCR-based method. **JAMA**, **265**: 472-77, 1991.
- BERNARD, H.; CHAN, S.; MANOS, M.M.; ONG, C.; VILLA, L.L.; DELIUS, H.; PEYTON, C.L.; BAUER, H.M.; WHEELER, C.H. Identification and assesment of known and novel human papillomavirus by polimerase chain reaction amplification, restriction fragment polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogeny algorithms. **J. Infect. Dis.**, **170**: 1077-85, 1994.
- BERNARD, H.U. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. **Antiviral therapy**, **7**: 219-37, 2002.
- BERNARD, H.U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. **J. Clin. Virol.**, **32S**: S1-S6, 2005.
- BERTOLETTI A, SETTE A, CHISARI FV, PENNA A, LEVRERO M, DE CARLI M, FIACCADORI F, FERRARI C Natural variants of cytotoxic epitopes are T-cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells. **Nature**.**369(6479)**:407-410, 1994.

- BERTORELLE, G.; EXCOFFIER, L. Inferring Admixture proportion from molecular data. **Mol. Biol. Evol.** **15** (10): 1298-1311, 1998.
- BERTORELLE, G.; EXCOFFIER, L. Inferring admixture proportions from molecular data. **Mol. Biol. Evol.** **15** (10): 1298-1311, 1998.
- BERUMEN J; ORDONEZ RM; LAZCANO E; SALMERON J; GALVAN SC; ESTRADA RA; 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.**, **93**(17):1325-30, 2001.
- BESKOW AH, JOSEFSSON AM, GYLLENSTEN UB. HLA class II alleles associated with infection by HPV16 in cervical cancer in situ. **Int. J. Cancer.** **93**(6):817-822, 2001.
- BIGNON, J. D. ; FERNANDEZ-VIÑA, M. 12th IHWG HLA class II reference protocol. In: **Twelfth International Histocompatibility Workshop and conference – Technical Handbook**, 1994.
- BJORKMAN, P.J.; SAPER, M.A.; SAMRAOUI, B.; BENNETT, W.S.; STROMINGER, J.L.; WILEY, D.C.; Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. **Nature**, **320**: 506-12, 1987.
- 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.**, **87**: 796-802, 1995.
- 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.**, **3**: 375-79, 1994.
- BRADY CS, DUGGAN-KEEN MF, DAVIDSON JA, VARLEY JM, STERN PL. Human papillomavirus type 16 E6 variants in cervical carcinoma: relationship to host genetic factors and clinical parameters. **J. Gen. Virol.**, **80**(12):3233-40, 1999.
- BROWN, J.H.; JARDETZKY, T.S.; GORGA, J.C.; STERN, L.J.; URBAN, R.G.; STROMINGER, J.L.; WILEY, D.C. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. **Nature**, **364**: 33-9, 1993.
- CALLEJA-MACIAS IE; KALANTARI M; HUH J; ORTIZ-LOPEZ R; ROJAS-MARTINEZ A; GONZALEZ-GUERRERO JF; WILLIAMSON AL; HAGMAR B; WILEY DJ; VILLARREAL L; BERNARD HU; BARRERA-SALDANA HA. Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants. **Virology**, **319**(2):315-23, 2004.
- 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.**, **176**: 353-61. 1997.
- CAVALLI-SFORZA, L.L.; MENOZZI, P.; PIAZZA, A. The history and geography of humans genes. Princeton, Princeton University, 1994. 518p.

- CERDAS-FLORES, R.M.; BUDOWLE, B.; JIN, L.; BARTON, S.A.; DEKA, R.; CHAKRABORTY, R. Maximum likelihood estimates of admixture in Northeastern Mexico using 13 Short Tandem Repeat loci. **Am. J. Hum. Biol.** **14**: 429-439, 2002.
- CHAKRABORTY R. Gene identity in racial hybrids and estimation of admixture rates. In: Neel JV, Ahuja Y. editors. Genetic microdifferentiation in man and other animals. New Delhi: Indian Anthropological Association. p. 171-180, 1985.
- CHAKRABORTY, R.; DEKA, R.; JIN, L.; FERRELL, R.E. Allele sharing at six VNTR loci and genetic distances among three ethnically defined human populations. **Am. J. Hum. Biol.**, **4**: 387-397, 1992.
- CHAKRABORTY, R.; KAMBOH, M.I.; FERRELL, R.E. Unique alleles in admixed populations: a strategy for determining hereditary population differences of disease frequencies. **Ethnic Disease**, **1**: 245-56, 1991.
- CHAN PK, LAM CW, CHEUNG TH, LI WW, LO KW, CHAN MY, CHEUNG JL, XU LY, CHENG AF. Human papillomavirus type 16 intratypic variant infection and risk for cervical neoplasia in southern China. **J. Infect Dis.**, **186(5)**:696-700, 2002.
- CHAN, S.Y.; BERNARD, H.U.; ONG, C.K.; CHAN, S.P.; HOFMANN, B.; DELIUS, H. Phylogenetic analysis of 48 papillomavirus types and 28 subtypes and variants: a showcase for the molecular evolution of DNA viruses. **J. Virol.**, **66**: 5714-25, 1992b.
- 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.**, **66**: 2057-66, 1992a.
- CRUZ MR, CERQUEIRA DM, CRUZ WB, CAMARA GN, BRIGIDO MM, SILVA EO, CARVALHO LG, MARTINS CR. Prevalence of human papillomavirus type 16 variants in the Federal District, Central Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** **99(3)**:281-2, 2004.
- CUZICK, J.; TERRY, G.; HO, L.; MONAGHAN, J.; LOPES, A.; CLARKSON, P.; DUNCAN, I. Association between high-risk HPV types, HLA DRB1* and DQB1* alleles and cervical cancer in British women. **Br. J. Cancer.**, **82 (7)**:1348-52, 2000.
- DAVID, A.L.M.; TAYLOR, G.M.; GOKHALE, D.; APLIN, J.D.; SEIF, M.W.; TINDALL, V.R. HLA-DQB1*03 and cervical intraepithelial neoplasia type III. **Lancet**, **340**: 52, 1992.
- DE ARAUJO SOUZA, P.S.; VILLA, L.L. Genetic susceptibility to infection with human papillomavirus and development of cervical cancer in women in Brazil. **Mut. Res.** **544**: 375-83, 2003.
- DE VILLIERS, E.M.; FAUQUET, C.; BROKER, T.R.; BERNARD, H.U.; ZUR HAUSEN. H. Classification of papillomaviruses. **Virology**, **324**: 17-27, 2004
- DEAN, M.; STEPHENS, J.C.; WINKLER, C.; LOMB, D.A.; RAMSBURG, M.; BOAZE, R.; STEWART, C. *et al.* Polymorphic admixture typing in human ethnic populations. **Am. J. Hum. Genet.**, **55**: 788-808, 1994.
- DEKA, R.; DECROO, S.; YU, L.M.; FERRELL, R.E.; Variable number oftandem repeat (VNTR) polymorphism at locus D17S5 (YNZ22) in four ethnically defined human populations. **Hum. Genetics**, **90**: 86-90, 1992.

- DEKA, R.; CHAKRABORTY, R.; DECROO, S.; ROTHHAMMER, F.; FERRELL, R.E. Characteristics of polymorphism at a VNTR locus 3' to the apolipoprotein B gene in five human populations. **Am. J. Hum. Genet.**, **51**: 1325-33, 1992.
- DEMBIC, Z.; HAAS, W.; WEISS, S.; McCUBREY, J.; KIEFER, H.; von BOEHMER, H.; STEINMETZ, M. Transfer of specificity by murine α and β T-cell receptor genes 232-38, 1986.
- DOORBAR, J. Large stages of the papillomavirus life cycle. **Papillomavirus Report**, **9 (5)**: 119-26, 1998.
- DUPANLOUP, I; BERTORELLE, G. Inferring admixture proportions from molecular data: extension to any number of parental populations. **Mol. Biol. Evol.** **18**(4): 672-675, (2001).
- DYSON, N.; HOWLEY, P.M.; MÜNGER, K.; HARLOW, E. The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science**, **243**: 934-37, 1989.
- ELLIS, J.R.M.; KEATING, P.J.; BAIRD, J.; HOUNSELL, E.F.; RENOUF, D.V.; ROWE, M.; HOPKINS, D.; DUGGAN-KEEN, M.F.; BARTHOLOMEW, J.S.; YOUNG, L.S.; 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.464-70, 1995.
- ESCHLE, D.; DÜRST, M.; TER MEULEN, J.; LUANDE, J.; EBERHARDT, H.C.; PAWLITA, M.; GISSMAN, L. Geographical dependence of sequence variation in the E7 gene of human papillomavirus type 16. **J. Gen. Virol.**, **73**: 1829-32, 1992.
- FAVRE, M.; BREITBURD, F.; CROISSANT, O.; ORTH, G. Structural polypeptides of rabbit, bovine papilloma viruses. **J. Virol.**, **15**: 1239-47, 1975.
- FERLAY, J.; BRAY, F.; PISANI, P. GLOBOCAN 2002: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC CancerBase No. 5. Version 2.0 Lyon: IARC Press, 2004.
- FERNANDEZ-VIÑA, M.; TIERCY, J.M.; TONAL, R.; KATOVICH-HURLEY, C.; TSAI, J.; STASTNY, P. DNA typing of DRB1 and DRB3 DR53-related specificities. In: TSUJI, K.; AIZAWA, M.; SASAZUKI, T. **HLA 1991 – Proceeding of the eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference**. Nova York: Oxford Scientific Publications, v, 1, 471-77, 1992.
- FIGUEIREDO, A. M. Belém dos imigrantes: história e memória, 1616 -2004 **Belém : Museu de Arte de Belém, 2004.**
- FRANCESCHI S. The IARC commitment to cancer prevention: the example of papillomavirus and cervical cancer. **Recent Results Cancer Res.**,**166**: 277-297, 2005.
- FRANCO, E.; VILLA, L.; ROHAN, T.; FERENCZY, A.; PETZL-ERLER, M.; MATLASHEWSKI, G. Design and methods of the Ludwig-McGill longitudinal study of the natural history of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Brazil. Ludwig-McGill Study Group. **Rev. Panam. Salud Publica**, **6**(4): 223-33, 1999.
- FRANCO, E.L.; VILLA, L.L.; RICHARDSON, H.; ROHAN, T.; FERENCZY, A. Epidemiology of cervical human papillomavirus infection. In: Franco, E. L. and Monsonego, J. Ed. **New Developments in Cervical Cancer and Prevention**. WHO/EUROGIN monograph, Blackwell Science p.14-22, 1997.

- FRAUMENI JR.; DEVESA, S.S.; HOOVER, R.N.; KINLEN, L.J. Epidemiology of cancer. In: De Vita jr. V.T.; Hellman, S.; Rosenberg, S.A. **Cancer: principles and practice of oncology**. 4^o. Ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Co., p. 150-81, 1993.
- GILES RE, BLANC H, CANN HM, WALLACE DC. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. **Proc Natl Acad Sci.**, 77(11): 6715-9, 1980.
- GONZALEZ-LOSA MDEL R, RODRIGUEZ-ANGULO E, MANZANO-CABRERA L, MEJIA-CAMARA J, PUERTO-SOLIS M. Detection of unusual strains of RV in patients with acute diarrhoea in Mexico. **J. Clin Virol.**, 32(4): 325-328, 2005.
- GREGOIRE, I.; 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**, 57: 504-07, 1994.
- HARDING, R. VNTRs in review. **Evol. Anthropol.**, 1: 62-71, 1992.
- HELLAND A, BORRESEN AL, KRISTENSEN G, RONNINGEN KS. DQA1 and DQB1 genes in patients with squamous cell carcinoma of the cervix: relationship to human papillomavirus infection and prognosis **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, 3(6): 479-486, 1994.
- HERTZBERG, M.; MICKLESON, K.N.P.; SERJEANTSON, S.W.; PRIOR, J.F.; TRENT, R.J. An asian-specific 9 pb deletion of mitochondrial DNA is frequently found in polinesians. **Am. J. Hum. Genet.**, 44: 504-10, 1989.
- HILDESHEIM, A.; SCHIFFMAN, M.; SCOTT, BROMLEY, C.; WACHOLDER, S.; HERRERO, R.; RODRIGUEZ, A.C.; BRATTI, M.C.; SHERMAN, M.E, LIN, U.S.Q-Q.; TERA, M.; BROMLEY, R.L.; BUETOW, K.; APPLE, R.J.; BURK, R.D. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. **J. Nat. Cancer Institute**, 93 (4): 315-318, 2001.
- 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.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.**, 7 (11):1035-41, 1998.
- 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.**, 67: 6413-23, 1993.
- HO, L.; CHAN, S.Y.; CHOW, V.; CHONG, T.; TAY, S.K.; 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.**, 29: 1765-72, 1991.
- HORAI, S.; HAYASAKA, K. Intraspecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mitochondrial DNA. **Am. J. hum. Genet.**, 48: 828-42, 1990.

- HORAI, S.; KONDO, R.; HATTORI, Y.N.; HAYASHI, S.; SONODA, S.; TAJIMA, K. Peopling of the Americas, founded by four major lineages of mitochondrial DNA. **Mol. Biol. Evol.**, **10**: 23-47, 1993.
- HUTZ, M.H.; MATTEVI, V.S.; CALLEGARI-JACQUES, S.M.; SALZANO, F.M.; COIMBRA JR., C.E.A.; SANTOS, R.V.; CARNESE, R.F.; GOICOECHEAS, A.S.; DEJEAN, C.B. D1S80 locus variability in South American Indians. **Ann. Hum. Bio.**, **24**: 249-255, 1997.
- IARC Working Group. **IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Chem. Man.** v. **64**, 1995.
- ICENOGLE, J.P.; SATHY, P.; MILLER, D.L.; TUCKER, R.A.; RAWLS, W.E. Nucleotide and amino acid sequence variation in the L1 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 6 and type 16. **Virology**, **184**: 101-7, 1991.
- INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil**; Rio de Janeiro, 1999.
- INGMAN M, KAESSMANN H, PAABO S, GYLLENSTEN U. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. **Nature**, **410(6828)**: 611, 2001.
- JEON, S.; LAMBERT, P.F. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **92**: 1654-58, 1995.
- JUNES, K.S. Variabilidade intratípica de HPV 16 e 18 em carcinomas do colo do útero de uma área de alto risco para o câncer cervical. Belém, 2000. 98 p. **Dissertação de Mestrado** – Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.
- KATSUYAMA, Y.; INOKO, H.; IMANISHI, T.; MIZUKI, N.; GOJOBORI, T.; OTA, M.; Genetic relationships among Japanese, northern Han, Hui, Uyghur, Kazakh, Greek, Saudi Arabian, and Italian populations based on allelic frequencies at four VNTR (D1S80, D4S43, COL2A1, D17S5) and one STR (ACTBP2) loci. **Hum. Hered.**, **48 (3)**: 126-37, 1998
- KIMURA, M.; OHTA, T. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. **Proc Natl Acad Sci.**, **75(6)**: 2868-2872, 1978.
- KOZUKA, T.; AOKI, Y.; NAKAGAWA, K.; OHTOMO, K.; YOSHIKAWA, H.; MATSUMOTO, K.; YOSHIIKE, K.; KANDA, Y. Enhancer-promoter activity of human papillomavirus type 16 long control region isolated from cell lines SiHa and CasKi and cervical cancer biopsies. **Jpn. J. Cancer** **91**: 271-279, 2000.
- LIZANO, M. & GARCIA-CARRANCÁ, A. Variantes moleculares de papiloma virus humanos 16, 18 y 45 en tumores del cuello uterino, en México. **Gac. Med. Mex.**, **133 (1)**: 43-48, 1997a.
- 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.**, **69**: 364-68, 1996.
- LÖRINCZ, A.T.; REID, R.; JENSON, A.B.; GREENBERG, M.D.; LANCASTER, W.; KURMAN, R.J. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. **Obstet. Gynecol.**, **79**: 328-37, 1992.

- MACIAG, P.C. & VILLA, L.L. Genetic susceptibility to HPV infection and cervical cancer. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **32**: 915-22, 1999.
- MACIAG, P.C.; SCHLECHT, N.; ARAUJO-SOUZA, P.S.; FRANCO, E.L.; PETZL-ERLER, M.L.; VILLA, L.L. Major histocompatibility complex class II polymorphism and risk for cervical cancer and human papillomavirus infection in Brazilian women. **Cancer Epidemiol. Bio. Prev.**, **9**: 1183-91, 2000.
- MACIAG, P.C.; VILLA, L.L.; Genetic susceptibility to HPV infection and cervical cancer. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **32**: 915-22, 1999.
- MATSUMOTO K, YASUGI T, NAKAGAWA S, OKUBO M, HIRATA R, MAEDA H, YOSHIKAWA H, TAKETANI Y. Human papillomavirus type 16 E6 variants and HLA class II alleles among Japanese women with cervical cancer. **Int. J. Cancer.**, **106(6)**:919-922, 2003.
- MEYER D, THOMSON G. How selection shapes variation of the human major histocompatibility complex: a review. **Ann. Hum. Genet.**, **65(1)**:1-26, 2001.
- MORAES, M.E; FERNANDEZ-VIÑA, M.; SALATIEL, I.; TSAI, S.; MORAES, J.R.; STASTNY, P. HLA class II DNA typing in two Brazilian populations. **Tissue Antigens**, **41**: 238-42, 1993.
- MOSS, D.J.; KHANNA, R. Major histocompatibility complex: from genes to function. **Imunol., Today**, **20 (4)**: 165-67, 1999.
- MUNÓZ, N.; Human papillomavirus and cervical cancer: epidemiological evidence. . In: Franco, E.L. and Monsonogo, J. Ed. **New Developments in Cervical Cancer Screening and Prevention**. WHO/EUROGIN monograph, Blackwell Science, p. 374-79, 1997.
- MURRAY JS. How the MHC selects Th1/Th2 immunity. **Immunol. Today**, **19(4)**:157-63. 1998
- 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**, **75**: 518-21, 1995.
- 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**, **82**: 203-7, 1999b.
- NORONHA, V.; MELLO, W.; VILLA, L.; BRITO, A.; MACÊDO, R.; BISI, F.; MOTA, R.; SASSAMOTO, K.; MONTEIRO, T.; LINHARES, A. Papilomavírus humano associado a lesões de cérvix uterina. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **32 (3)**: 235-40, 1999.
- NOVELLI, G.; SPINELLA, A.; GENNARELLI, M.; MINGARELLI, R.; DALLAPICCOLA, B. Análisis of Apo-B, HLADQ alpha, and D1S80 polymorphisms in the Italian population using the polymerase chain reaction. **Am. J. Hum. Biol.**, **4**: 381-386, 1992.
- 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 amino acid sequences**. Los Alamos National Laboratory, p. III 21-41, 1995.

- ODUNSII, K.; TERRY, G.; HO, L.; BELL, J.; CUZICK, J.; GANESAN, T.S. Susceptibilidade to human papillomavirus-associated cervical intra-epithelial neoplasia is determined by specific HLA DR-DQ alleles. **Int. J. Cancer**, **67**: 595-02, 1996.
- ONG, C.K.; CHAN, S.Y.; CAMPO, M.S.; FUGINAGA, K.; MAVROMARA-NAZOS, P.; LABROPOULOU, V.; PFISTER, H.; TAY, S.K.; TER MEULEN, J.; VILLA, L.L.; BERNARD, H.U. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect co evolution with human ethnic groups. **J. Virol.**, **67**: 6424-31, 1993.
- Parsons TJ.; Holland, M.M.; mitochondrial mutation rate revised: hot spots and polymorphism **Nat. Gen.**, **18**: 110, 1998
- PICCONI, A.; ALONIO, L.V.; SICHERO, L.; GOZÁLEZ, J.V.; GRONDA, J.; MIRANDA, S.; VILLA, L.L.; TEYSSIÉ, A.R. Virus papilloma humano (HPV) en mujeres Quechuas: tipos virales y variantes de HPV-16. In: Congreso Argentino de Virologia, Buenos Aires, Argentina. **Resumos**, agosto 1999.
- REMMINK, A.J.; WALBOOMERS, J.M.M.; HELMERHORST, T.J. M.; VOORHORST, F.J.; ROZENDAAL, L.; RISSE, E.K.J.; MEIJER, C.J.L.M.; KENEMANS, P. The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months. **Int. J. Cancer**, **61**: 306-11, 1995.
- RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.K.; PEREIRA, J.M.; LOBATO, M.R.; CARVALHO, B.M.; GUERREIRO, J.F.; BATISTA-DOS-SANTOS, S.E. Dissimilarities in the process of formation of Curiau, a semi-isolated Afro-Brazilian population of the Amazon region. **Am. J. Hum. Biol.**, **14**(4):440-447, 2002.
- RODRIGUES, J.A. Análise da estrutura genética da população de Belém utilizando polimorfismos de DNA nuclear, mitocondriais e do cromossomo Y. Belém, 1999. 177p. **Dissertação de Mestrado** – Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2^o Ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SVEJGAARD, A.; RYDER, L.P. HLA and disease association: detecting the strongest association. **Tissue Antigens**, **43**: 18-27, 1994.
- SANJEEVI, C.B.; HJELMSTRÖM, P.; HALLMANS, G.; WIKLUND, F.; LENNER, P.; ANGSTRÖM, T.; DILLNER, J. LERNMARK, A. Different HLADR-DQ haplotypes are associated with cervical intraepithelial neoplasia among human papillomavirus type-16 seropositive and seronegative swedish women. **Int. J. Cancer**, **68**: 409-14, 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 French woman with HPV-positive carcinoma of the cervix. **Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)**, **69**: 159-64, 1996.
- 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**, **75**: 495-505, 1993.

- SCHEFFNER, M.; WERNESS, B.A.; HUIBREGTSE, J.M.; LEVINE, A.J.; HOWLEY, P.M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. **Cell**, **63**: 1129-36, 1990.
- 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. Epidemiological evidence showing papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. **J. Natl. Cancer Inst.**, **85**: 958-64, 1993.
- SCHNEIDER, S., ROESSLI, D., AND EXCOFFIER, L. Arlequin: A software for population genetics data analysis. Ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva, 2000.
- SEDMAN SA, BARBOSA MS, VASS WC, HUBBERT NL, HAAS JA, LOWY DR, SCHILLER JT. The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. **J. Virol.**, **65**(9):4860-6, 1991.
- SHERLAW-JOHNSON, C.; GALLIVAN, S.; JENKINS, D. Evaluating cervical cancer screening programmes for developing countries. **Int. J. Cancer**, **72**: 210-16, 1997.
- SHERMAN, L.; JACKMAN, A.; LTZHAKI, H.; STÖPPLER, M.C.; KOVAL, D.; SCHLEGELT, R. Inhibition of Serum and Calcium-Induced Differentiation of Human Keratinocytes by HPV16 E6 Oncoprotein: Role of p53 Inactivation. **Virol.**, **237**: 296-306, 1997.
- SHRIVER, M.D.; JIN, L.; BOERWINKLE, E.; DEKA, R.; FERREL, R.E.; CHAKRABORTY, R. A novel measure of genetic distance for highly polymorphic tandem repeat loci. **Mol. Biol. Evol.**, **12** (5): 914-920, 1995.
- SHRIVER, M.D.; SMITH, M.W.; JIN, L.; MARCINI, A.; AKEY, J.M.; DEKA, R.; FERRELL, R.E. Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers. **Am. J. Hum. Genet.**, **60**: 957-964, 1997.
- SICHERO, L.; FRANCO, E.L.; VILLA, L.L. Different P105 Activities among natural variants of human papillomavirus type 18. **J. Infect. Dis.** **191**: 739-42, 2005.
- SILVA, W.A.JR.; BORTOLINI, M.C.B.; MEYER, D.; SALZANO, F.M.; SCHNEIDER, M.C.P.; ELION, J.; KRISHNAMOORTHY, R.; DE GUERRA, D.C.; LAYRISSE, Z.; CASTELLANO, H.M.; WEIMER, T.A.; ZAGO, M.A. Diversity of six hypervariable loci studied in two African and 16 South American populations. **Am. J. Phys. Anthropol.**, **109**(4):425-37, 1999.
- SLATKIN, M. A Measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, **139**: 457-462.
- STONEKING, M. DNA and recent human evolution. **Evolutionary Anthropology**, **92**: 60-73, 1993.
- 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.**, **70**: 6987-93, 1996.
- STOREY, A. & BANKS, L. Human papillomavirus type 16 E6 oncogene cooperates with EJ-ras to immortalize primary mouse cells. **Oncogene**, **8**: 919-24, 1993.

- TORRONI, A.; CHEN, Y.S.; SEMINO, O.; SANTACHIARA-BENECERETTI, A.S.; SCOTT, C.R.; LOTT, M.T.; WINTER, M.; WALLACE, D.C. mtDNA and Y chromosome polymorphisms in four native American populations from Southern Mexico. *Am. J. hum. Genet.*, 54: 303-18, 1994.
- TORRONI, A.; SCHURR, T.; CABELL, M.; BROWN, M.; NEEL, J.; LARSEN, M.; SMITH, D.; VULLO, C.; WALLACE, D. Asian affinities and continental radiation of the four founding native american mtDNAs. *Am. J. Hum. Genet.*, 53: 563-590, 1993.
- VALLINOTO, A.C.R.; CAYRES-VALLINOTO, I.M.V.; ZAGO, M. A.; SANTOS, S.E.B.; GUERREIRO, J.F. D1S80 Polymorphism in Amerindians from the Amazon Region of Brazil. *Hum. Biol.*, 70(3): 507-516, 1998.
- VANDENVELDE, C., de FOOR, M.; van BEERS, D. HLA-DQB1*03 and cervical intraepithelial neoplasia grades I. *Lancet* 341: 442, 1993.
- VERESS, G.; SZARKA, K.; DONG, X-P.; GERGELY, L.; PFISTER, P. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J. Gen. Virol.*, 80: 1035-43, 1999.
- VERNON, S.D.; UNGER, E.R.; MILLER, D.R.; LEE, D.R.; REEVES, W.C. Association of human papillomavirus type 16 integration in the E2 gene with poor disease-free survival from cervical cancer. *Int. J. Cancer*, 74: 50-56, 1997.
- VILLA, L.L.; RAHAL, P.; FRANCO, E.L. Molecular variant analysis as a tool in natural history studies of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. In: Franco, E. L. Ed. **New Developments in Cervical Cancer Screening and Prevention**. WHO/EUROGIN monograph, Blackwell Science p. 374-79, 1997.
- VILLA, LL. Vaccines against papillomavirus infections and disease. *Salud Pública de México*, 45 (3): 443-448, 2003.
- WALLACE, D.C.; GARRISON, K.; KNOWLER, W.C. Dramatic founder effects in Amerindian mitochondrial DNAs. *Am. J. Physical Anthropol.*, 68: 149-55, 1985.
- WANK, R. & THOMSEN, C. High risk of squamous cell carcinoma of the cervix for women with HLA-DQw3. *Nature*, 352: 723-25, 1991.
- WANK, R., MEULEN, J., LUANDE, J., EBERHARDT, H., PAWLITA, M. Cervical intraepithelial neoplasia, cervical carcinoma, and risk for patients with HLA-DQB1*0602, *0301, *0303 alleles. *Lancet* 341: 1215, 1993.
- WERNES, B.A.; LEVINE, A.J.; HOWLEY, P.M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*, 248: 76-79, 1990.
- WHEELER, C.M.; YAMADA, T.; HILDESHEIM, A.; JENISON, S.A. Human papillomavirus type 16 sequences variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 35: 11-19, 1997.
- WOOLF, B.; On estimating the relation between blood group and disease. *Ann. Hum. Genet.*, 19: 251-53, 1955.
- XI LF; CARTER JJ; GALLOWAY DA; KUYPERS J; HUGHES JP; LEE SK; ADAM DE; KIVIAT NB; KOUTSKY LA. Acquisition and natural history of human papillomavirus type

- 16 variant infection among a cohort of female university students. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**; **11(4)**:343-51, 2002.
- XI, L.F.; CARTER, J.J.; GALLOWAY, D.A.; KUYPERS, J.; HUGHES, J.P.; LEE, S.K.; ADAM, D.E.; KIVIAT, N.B.; KOUTSKY, L.A. Acquisition and natural history of human papillomavirus type 16 variant infection among a cohort of female university students. **Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prevention**, **11**: 343-351, 2002.
- 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.**, **172**: 747-55, 1995.
- YAMADA, T.; MANOS, M.; PETO, J.; GREER, C.E.; MUÑOZ, N.; BOSCH, X.; WHEELER, C.M. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. **J. Virol.**, **71**: 2463-72, 1997.
- ZAGO, M.A.; SILVA, W.A. Jr.; TAVELLA, M.H.; SANTOS, S.E.B.; GUERREIRO, J.F.; FIGUEIREDO, M.S. Interpopulational and intrapopulational genetic diversity of Amerindians as revealed by six variable number of tandem repeats. **Hum. Hered.**, **46**: 274-289, 1996.
- ZEHBE I, MYTILNEOS J, WIKSTROM I, HENRIKSEN R, EDLER L, TOMMASINO M. Association between human papillomavirus 16 E6 variants and human leukocyte antigen class I polymorphism in cervical cancer of Swedish women. **Hum. Immunol.**, **64(5)**: 538-542, 2003.
- ZEHBE I, VOGLINO G, DELIUS H, WILANDER E, TOMMASINO M. Risk of cervical cancer and geographical variations of human papillomavirus 16 E6 polymorphisms. **Lancet**. **352(9138)**:1441-2, 1998b.
- ZEHBE, I.; WILANDER, E.; DELIUS, H.; TOMMASINO, M. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. **Cancer Res.**, **58**: 829-33, 1998a.
- ZUR HAUSEN H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat. Rev. Cancer.**, **2(5)**:342-50, 2002.
- ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancer. **Biochim. Biophys. Acta**, **1288**: F55-F78, 1996.