

DENISE DA ROCHA PITTA LIMA DE MORAES

**DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO PAPILOMAVÍRUS
HUMANO (HPV) EM MULHERES COM NEOPLASIA
INTRA-EPITELIAL CERVICAL DE ALTO GRAU**

Dissertação de Mestrado

**ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. SOPHIE F. M. DERCHAIN
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIS OTÁVIO SARIAN**

**Unicamp
2008**

DENISE DA ROCHA PITTA LIMA DE MORAES

**DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO PAPILOMAVÍRUS
HUMANO (HPV) EM MULHERES COM NEOPLASIA
INTRA-EPITELIAL CERVICAL DE ALTO GRAU**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de
Mestre em Tocoginecologia, área de
Ciências Biomédicas

**ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. SOPHIE F. M. DERCHAIN
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIS OTÁVIO SARIAN**

**Unicamp
2008**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M791d Moraes, Denise da Rocha Pitta Lima de
Detecção e genotipagem do papilomavírus humano
(HPV) em mulheres com neoplasia intra-epitelial cervical
de alto grau. / Denise da Rocha Pitta Lima de Moraes.
Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadores: Sophie Françoise Mauricette Derchain,
Luis Otávio Sarian

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Papilomavírus humano. 2. Genotipagem. 3. Colo
uterino. I. Derchain, Sophie Françoise Mauricette. II. Sarian,
Luis Otávio. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em ingles: Detection and genotyping of the human papillomavirus (HPV) in women with
high grade cervical intraepithelial neoplasia

Keywords: Human papillomavirus
Genotyping
Cervix uteri

Área de Concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Mestrado em Tocoginecologia

Banca examinadora: Prof^a.Dr^a. Sophie Françoise Mauricette Derchain
Prof^a.Dr^a. Silvana Maria Quintana
Prof^o Dr^o Paulo César Giraldo

Data da defesa: 26 – 02 – 2008

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: DENISE DA ROCHA PITTA LIMA DE MORAES

Orientador: Prof.^a Dr.^a SOPHIE F. M. DERCHAIN

Co-Orientador: Prof. Dr. LUIS OTÁVIO SARIAN

Membros:

1.

Sop - Der

2.

3.

Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 26/02/2008

200813802

Dedico este trabalho...

Aos meus filhos Juliano, Beatriz e Carolina
que me fazem feliz.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Sophie Françoise Mauricette Derchain, que com grande inteligência e competência me conduziu durante esta pesquisa e me levou a exceder o limite do meu conhecimento, provocando o desejo de novas realizações.

Ao Prof. Dr. Luís Otávio Zanatta Sarian, pela co-orientação, atenção e disponibilidade em todos os momentos deste processo acadêmico.

À bióloga Elisabete Aparecida Campos, amiga, companheira, pela ajuda e respeito na convivência diária.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Levi do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de São Paulo e seus colaboradores pelo apoio na utilização do espaço físico e equipamentos.

À Profa. Dra. Sílvia Helena Rabelo Santos, pelo apoio, disponibilidade e exemplo profissional.

Aos Professores Helaine Milanez, Dulcinéia Albuquerque e Paulo César Giraldo pelas valiosas avaliações no processo de qualificação, muitas delas incorporadas a esta dissertação.

À Margarete Souza Donadon, secretária da pós-graduação, pela atenção e auxílio na realização dos procedimentos acadêmicos.

*As amigas, Priscila Portugal, Eliana Montemor, Maria Cristina Westin e Eliane Brolazo,
pelo carinho e incentivo.*

*Aos colegas do Laboratório Clínico Especializado que contribuíram de alguma forma
para a realização deste trabalho.*

Ao meu marido, Lauro que acredita e apóia os meus projetos de vida.

À minha família pelo amor, carinho, suporte, incentivo e compreensão.

*Este estudo foi financiado pela
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
Processo nº 04/09309-5 e Conselho de Desenvolvimento Científico
e Tecnológico (CNPq), Processo número 307252/2004-3*

*O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.*

Cora Coralina

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	x
Resumo	xii
Summary	xiv
1. Introdução	16
2. Objetivos	28
2.1. Objetivo geral	28
2.2. Objetivos específicos.....	28
3. Publicação.....	29
4. Conclusões.....	55
5. Referências Bibliográficas.....	56
6. Anexos	61
6.1. Anexo 1 –Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	61

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

A7	Alpha 7
A9	Alpha 9
BLAST	<i>Basic Local Alignment and Search Tool</i>
bp	Pares de base (<i>base pairs</i>)
CA	<i>Califórnia</i>
CH2	Captura Híbrida 2
CNPq	Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	Ácido desoxirribonucléico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
Edta	<i>Ethylenediaminetetracetic acid</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
H&E	Hematoxilina e eosina (<i>Hematoxin and eosin</i>)
HPV	Papilomavírus humano (<i>Human papillomavirus</i>)
HSIL	Lesão intra-epitelial de alto grau (<i>High Squamous Intraepithelial Neoplasia</i>)
IARC	<i>Agency for Research on Cancer</i>
LA-HPV	<i>Linear Array – human papillomavirus</i>
LLETZ	<i>Large loop excision of the transformation zone</i>
LSIL	Lesão intra-epitelial de baixo grau (<i>Low Squamous Intraepithelial Neoplasia</i>)

µg/ml	Micrograma(s) por mililitro(s)
µl	Microlitro(s)
M	Molar
MD	<i>Maryland</i>
Min	Minuto(s) (<i>minutes</i>)
mM	Milimolar
Na AC	Acetato de sódio
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
NIC/CIN	Neoplasia intra-epitelial cervical (<i>Cervical intraepithelial neoplasia</i>)
NJ	<i>New Jersey</i>
°C	Graus Celsius (<i>Celsius degrees</i>)
OR	Razão de chance (<i>Odds Ratio</i>)
Pap	<i>Papanicolaou</i>
PCR	<i>Reação em cadeia da polymerase (Polymerase Chain Reaction)</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
TE	<i>Trishydroxymethylaminomethane/ethylenediaminetetracetic acid</i>
TRIS	<i>Trishydroxymethylaminomethane</i>
UCM	Meio de coleta universal (<i>Universal collection medium</i>)
UFG	Universidade Federal de Goiás
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
USA	Estados Unidos da América do Norte (<i>United State of América</i>)
VLP	<i>Virus like particle</i>
Xg	Veze a medida da gravidade da Terra

Resumo

Introdução: Este estudo faz parte de uma linha de pesquisa cuja finalidade é avaliar testes de detecção de papilomavírus humano (HPV) envolvidos na carcinogênese e rastreamento de câncer cervical. Até recentemente, a captura híbrida 2 (HC2) para detecção de um *pool* de HPV de alto risco oncogênico foi o método clínico mais estudado por este grupo. Entretanto, frente à evidente diferença no risco de evolução das lesões cervicais, a genotipagem do HPV através de análise do ácido nucléico passou a ser relevante. **Objetivo:** Avaliar a distribuição de infecções simples e múltiplas de diferentes tipos de HPV em mulheres com neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau (NIC2 e NIC3).

Sujeitos e Métodos: Foram avaliados os genótipos específicos de HPV da amostra cervical de 106 mulheres utilizando Roche *Linear Array*® *human papillomavirus* (LA-HPV) *genotyping assay* (Roche Diagnostics, USA). O material foi coletado antes da conização cervical. Foram comparadas as proporções de NIC2 e NIC3 em grupos de mulheres infectadas com tipos de HPV dos grupos filogenéticos Alfa7 (A7) e Alfa9 (A9). Três situações foram consideradas: mulheres com 1) infecção simples; 2) infecção múltipla; 3) infecção simples e múltipla. Foram comparadas as proporções de diferentes

combinações de tipos de HPV em grupos de mulheres com NIC2 e NIC3.

Resultados: Pelo menos um tipo de HPV foi detectado em 99% das amostras. Infecções múltiplas foram detectadas em 68 (64,7%) das amostras. Os genótipos de alto risco mais freqüentemente detectados em infecção simples ou múltipla foram HPV16 (57,1%), HPV58 (24,7%), HPV33 (15,2%), HPV52 (13,3%), HPV31 (10,4%) e HPV51 (7,6%) e HPV18 (6,6%). A probabilidade de mulheres com NIC3 serem infectadas com HPV da espécie A9 foi maior. Os HPV 16 e ou 18, associados ou não com outros tipos virais foram mais frequentemente encontrados nas mulheres com NIC3 do que naquelas com NIC2. **Conclusão:** A severidade da NIC esteve associada com a presença de tipos de HPV incluídos na classificação filogenética A9 e por infecções que incluem HPV16 e 18 combinados ou não com outros genótipos de HPV.

Summary

Objective: To evaluate the distribution of single and multiple infections of different human papillomavirus (HPV) types in women with high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2 and CIN3) and to assess the relation of the various combinations of virus with the severity of CIN. **Subject and methods:** Cervical samples from 106 women treated due to CIN2 (18) or CIN3 (88) were examined for specific HPV genotypes using Roche Linear Array® Human Papillomavirus (LA-HPV)(Roche Diagnostics, USA). The material was collected immediately before cervical conization. The proportion of CIN2 and CIN3 in groups of women infected with varying HPV phylogenetic groups Alpha7 (A7) and Alpha9 (A9) was compared. Three situations were considered: women with 1) single infection; 2) multiple infections; 3) the whole sample. The proportions of CIN2 and CIN3 in groups of women with different combinations of HPV types were compared. **Results:** At least one HPV type was detected in 99% of the whole series. Multiple infections were detected in 68 (64.7%) samples. The most frequent high-risk genotypes detected (single/multiple) were HPV16 (57.1%), HPV58 (24.7%), HPV33 (15.2%), HPV52 (13.3%), HPV31 (10.4%), HPV51 (7.6%) and HPV18 (6.6%). Women with CIN3 were more infected with HPV of

species A9. HPV16 and/or HPV18, associated or not with other viral types, were more frequently found in specimens of women with CIN3 than in those of women with CIN2. **Conclusions:** the severity of high-grade CIN may be associated by the presence of HPV types included in the A9 phylogenetic classification and by infections including HPV16 and 18 combined or not with other HPV genotypes.

1. Introdução

O câncer cervical é um importante problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento. Apresenta no Brasil uma taxa de incidência de cerca de 25,8 por 100.000 mulheres (IARC, 2006). Estima-se que em 2008 será o segundo tipo de câncer mais comum em mulheres brasileiras (INCA, 2007). A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) é atualmente considerada uma causa necessária, contudo, insuficiente para o desenvolvimento de câncer cervical e suas lesões precursoras. Infecções por HPV são muito comuns em mulheres jovens, mas com frequência resolvem-se espontaneamente (Baseman e Koutsky, 2005). O câncer seria uma consequência rara e desenvolvida em longo prazo a partir de uma infecção com certos tipos de HPV (Bosch et al., 1995; Walboomers et al., 1999, Bosch et al., 2003, Snijders et al., 2006).

Cerca de 40 tipos de HPV estão relacionados à patologia do trato genital inferior feminino, sendo que entre eles 15 são considerados de alto risco oncogênico (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82), sendo mais três tipos designados como provavelmente de alto risco (26, 53 e 66). Muitos desses HPV

estão filogeneticamente relacionados com o HPV16 e associados a este, agrupados na espécie 9 do gênero Alpha (31, 33, 35, 52 e 58) e outros agrupados na espécie 7 do mesmo gênero, associados ao HPV18 (39, 45, 59 e 68). Embora tenha sido confirmada uma eficácia de quase 100% com vacinas *virus like particle* (VLP) contra o epítipo L1 dos HPV16 e 18, essas vacinas apresentam pouca ou nenhuma proteção contra outros HPV, mesmo filogeneticamente relacionados. Encontrou-se apenas uma proteção cruzada muito boa para HPV45 e apenas parcial para HPV31 (Harper et al., 2006).

A distribuição dos diversos genótipos de HPV varia segundo os continentes e esta distribuição foi objeto de estudo de meta-análises coordenadas pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC). Embora a distribuição dos tipos 16 e 18 seja amplamente consistente em todo o mundo, outros tipos de alto risco como os HPV31, 33, 45, 52 e 58 apresentam grande variação entre os diferentes continentes (Clifford et al., 2005; Sanjosé et al., 2007; Smith et al., 2007).

Em relação ao carcinoma invasor, Smith et al. (2007) incluíram 130 estudos, totalizando 14.595 casos, dos quais 9.494 carcinomas de células escamosas e 1.949 adenocarcinomas eram positivo para HPV. Verificaram que cerca de 70% dos casos estavam associados com infecção por HPV16 (55%) ou HPV18 (12,8%). Entretanto, a proporção de infecção com HPV16 e 18 é maior na Europa, América do Norte e Oceania (74% a 77%) do que na África, Ásia e Américas do Sul e Central (65% a 70%). Os outros tipos mais comuns de HPV em ordem decrescente foram: HPV45, 31, 33, 52, 58, e 35 em todas as regiões exceto a Ásia, onde os HPV tipos 58 e 52 tiveram a prevalência relativamente mais alta.

No adenocarcinoma, a prevalência global de HPV foi significativamente menor (85%) quando comparado com carcinoma de células escamosas (90%), e o HPV18 foi o tipo predominante em todas as regiões (37%), seguido pelos 16 (33%) e 45 (5,7%). Embora a maioria dos carcinomas escamosos fosse associada com HPV 16 ou 18 em todas as regiões, aproximadamente um terço desses cânceres esteve associado com outro tipo viral e essa distribuição parece ser a mesma em todos continentes. Nesta meta-análise, o Brasil entrou com quatro estudos (Bosch et al., 1995; Eluf-Neto et al., 1994; Lorenzato et al., 2000; Rabelo-Santos et al., 2003), sendo que a maior prevalência de HPV foi do tipo 16 (56,5%), seguido pelos 18 (21,9%), 31 (6,8%) e 33 (6,0%).

Nas lesões intra-epiteliais de alto grau (HSIL), o tipo 16 foi o mais prevalente, representando 45,3% dos casos positivos para HPV (Smith et al., 2007). Neste estudo, das 7.094 mulheres incluídas 44% dos casos foram detectados citologicamente e classificados pelo sistema Bethesda e os diagnosticados histologicamente foram NIC2 (17%), NIC3 (37%) e carcinoma *in situ* (2%). A variação geográfica, entretanto, foi muito grande sendo que o HPV16 aparece associado a 52% das lesões de alto grau na Europa e em apenas 34% na Ásia. O HPV18 aparece consistentemente em terceiro ou quarto lugar, com 6% na Europa e 9,8% nos EUA. Já os outros tipos, 31, 33, 35, 45, 52 e 58 variam muito mais segundo as diferentes regiões. Nesta meta-análise, o Brasil entrou com dois estudos (Lorenzato et al., 2000; Câmara et al., 2003), sendo que o tipo de HPV mais prevalente foi o 16 (43,6%), seguido pelo 58 (8,7%), 31 (5,8%) e 33 (5,2%).

O que se conclui é que os HPV16, 18 e 45 foram mais prevalentes em mulheres com carcinoma escamoso invasor quando comparadas com mulheres com HSIL, sendo os HPV31, 33, 52 e 58 de maior prevalência em mulheres com lesões de alto grau. Assim, poderia inferir-se que lesões de alto grau causadas por HPV16, 18 e 45 preferencialmente progridem para carcinoma escamoso invasor.

Quando avaliadas mulheres com alterações citológicas compatíveis com lesão intra-epitelial de baixo grau (LSIL), Clifford et al. (2005) incluíram 8.308 casos oriundos de 55 estudos. A prevalência total de HPV é de 80% na América do Norte e menor que 70% em outras regiões, diferença essa atribuída aos critérios utilizados para o diagnóstico destas lesões. Entre as 5910 mulheres com lesões de baixo grau HPV-positivas, o HPV16 foi o tipo mais comum (26,3%), seguido pelo 31 (11,5%), 51 (10,6%) e 53 (10,2%). Entretanto, a proporção de mulheres com LSIL HPV-positivas provenientes da África tinham risco duas vezes menor de ser infectadas pelo HPV16 quando comparadas com mulheres européias. Mulheres HPV-positivas da América do Norte tinham mais chances de ser infectadas pelo HPV18 do que aquelas da Europa e América do Sul ou Central. Nesta meta-análise, o Brasil contribuiu com dois estudos (Franco et al., 1999; Lorenzato et al., 2000), sendo que o tipo de HPV mais prevalente foi o 16 (22,7%), seguido pelo 31 (16,8%), 51 (14%) e 53 (14%). A interpretação dos dados relacionados a outros tipos virais foi dificultada pelas diversas técnicas utilizadas na detecção do HPV. Quando compararam as prevalências dos HPV16 e 18 em carcinoma escamoso invasor e LSIL,

observaram que as prevalências de HPV16 e 18 foram 2 vezes e 1,5 vezes maiores, respectivamente, no carcinoma invasor do que na LSIL, sendo que esta proporção variou de 0,05 a 0,85 para outros tipos.

Finalmente, Sanjosé et al. (2007) avaliaram a distribuição dos diversos tipos de HPV em mulheres com citologia normal de 78 estudos, entre estes um estudo brasileiro (Munoz et al., 1996). Incluíram 157.879 mulheres randomicamente selecionadas da população geral de 15 regiões do mundo, África, Américas do Sul, Central e Norte, Europa e Ásia. A prevalência geral de HPV foi de 10,4%, variando de 22,1% na África a 8,0% na Ásia. Os cinco tipos de HPV mais comuns em mulheres HPV-positivas foram HPV16, seguido pelos 18, 31, 58 e 52, representando 50% de todas as infecções por HPV. Embora os HPV tipos 16 (2,5%) e 18 (0,9%) sejam os mais prevalentes, a distribuição dos outros tipos varia conforme a região. No Japão, Taiwan e Leste da África o HPV52 é o mais comum. O HPV18 foi o mais freqüente em todas as regiões, exceto no Sul da Europa, e o HPV53 estava entre os cinco tipos de HPV mais comuns nas mulheres do Leste da África e Américas do Norte e Central.

Tipos específicos de HPV podem determinar diferentes riscos para a persistência e a progressão determinada pelo vírus. O risco de carcinoma cervical é principalmente associado aos HPV16, 18 e 45 (Smith et al., 2007). Quando persiste por dois anos, o HPV16 possui maior capacidade de causar NIC e câncer do que qualquer outro tipo potencialmente oncogênico (Wheeler et al., 2006). Comparativamente, outros tipos têm um risco absoluto muito menor (Snijders et al., 2006). Wheeler et al. (2006) demonstraram que

infecções não relacionadas ao tipo 16 mostraram um risco coletivo de NIC3 de aproximadamente um quinto do determinado pelo tipo 16. Contudo, outros tipos de HPV menos comuns na população geral e em mulheres com NIC e câncer têm limitado a precisão das estimativas de risco (Wheeler et al., 2006). Apesar desta limitação, estudos têm demonstrado que o HPV33 possui menor potencial oncogênico em termos de progressão de NIC3 para carcinoma comparado com o HPV18 e HPV45 (Snijders et al., 2006). O HPV16 mostra maior risco tanto para NIC2 ou NIC3 quanto para carcinoma invasivo (Smith et al., 2007). Excluindo o HPV do tipo 16, os tipos encontrados na NIC2 (51, 52, 31, 35) são diferentes daqueles observados na NIC3 (52, 39, 18) e dos comumente presentes no câncer invasivo (Prétet et al., 2007; Zuna et al., 2007).

Outro aspecto a ser considerado é a infecção múltipla, sendo que alguns dados sugerem que as infecções múltiplas possam ter um efeito sinérgico na carcinogênese. Estudos sobre a história natural da infecção mostram um risco aumentado para a aquisição de novos tipos de HPV por mulheres já infectadas comparadas com mulheres negativas para HPV (Liaw et al., 2001; Rousseau et al., 2001). Outra interpretação desses achados é de que mais do que um tipo de HPV seja transmitido simultaneamente, a detecção seqüencial deles é consequência do ciclo de replicação que é assíncronico e somente ocasionalmente se sobrepõe (Weissenborn et al., 2003). Esses ciclos de vida seriam interdependentes (Woodman et al., 2007). Trottier et al. (2006) avaliaram a associação entre infecção por múltiplos HPV e lesões cervicais entre 2.462 mulheres brasileiras que participaram da coorte Ludwig-McGill, sendo que 1,9%

a 3,2% das mulheres tinham infecção por múltiplos vírus. Quando avaliadas cumulativamente, durante o primeiro ano e durante os primeiros quatro anos de seguimento, 12,3% a 22,3% foram infectadas por múltiplos vírus. A incidência de lesões de alto grau aumentou muito com o aumento do número de tipos virais infectantes, com uma razão de chance (OR) de 41 vezes para infecção simples comparada com 92 vezes para dois ou três tipos e 424 vezes para quatro a seis tipos, quando comparadas com mulheres consistentemente negativas para qualquer HPV.

Assim, embora seja desejável uma vacina capaz de evitar todos os casos de câncer do colo, este certamente não será o caso com os produtos em vias de comercialização. Limitações técnicas e econômicas impossibilitaram o desenvolvimento de vacinas contra todos os tipos de HPV com potencial oncogênico, sendo que o caminho natural encontrado pelos fabricantes foi o de concentrar esforços no desenvolvimento de imunizantes para os tipos virais de maior risco e prevalência, ou seja, os HPV16 e 18. A vacina da Merck Sharp & Dohme também imuniza contra os tipos 6 e 11, responsáveis por cerca de 90% das verrugas genitais, embora não implicados na gênese do câncer do colo (Lowy e Schiller, 2006). Restam, portanto, no mínimo mais 15 outros tipos de HPV até então conhecidos, para cuja infecção não haverá profilaxia.

Vários protocolos de estudo vêm propondo o uso de técnicas de detecção do HPV em circunstâncias clínicas diversas, incluindo o rastreamento do câncer de colo e o seguimento de mulheres submetidas a tratamentos conservadores de lesões pré-invasoras. Seguramente, o advento das vacinas

para HPV trará mais demanda por técnicas de detecção do vírus que permitam a identificação do tipo viral.

Entretanto, o número de mulheres e representação geográfica incluídos nos estudos que caracterizam o tipo viral são relativamente restritos, pois até hoje a metodologia mais utilizada para detecção do HPV em estudos epidemiológicos é a Captura Híbrida 2 (CH2) (Digene Co., Gaithersburg, MD, USA), único teste comercial aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para diagnóstico. Contudo, a CH2 utiliza um conjunto de sondas determinadas para 13 tipos de HPV classificados como de alto risco, mas não identifica cada tipo (Iftner e Villa, 2003).

Esta metodologia está hoje clinicamente validada e tem sido muito usada para o diagnóstico clínico do HPV, mesmo não fornecendo informações específicas com relação aos tipos presentes na amostra (Hubbard, 2003). Entretanto, existe uma diferença no potencial oncogênico entre os diferentes HPV de alto risco, reforçando a importância da tipagem do HPV (van Hamont et al., 2006).

Os métodos biomoleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) são os mais utilizados para genotipagem de HPV. A PCR amplifica seletivamente uma sequência de nucleotídeos com um aumento exponencial e reprodutível. A sensibilidade e especificidade da PCR podem variar, dependendo principalmente da escolha do conjunto de *primers*; número de pares de base do produto amplificado pela PCR; desempenho da DNA

polimerase usada na reação; espectro do tipo DNA-HPV amplificado e capacidade em detectar diferentes tipos na infecção (Iftner e Villa, 2003).

A PCR pode usar *primers* do tipo-específico para detecção de um único tipo de HPV; portanto na amostra contendo mais de um tipo de HPV, várias reações de PCR devem ser feitas separadamente com pares de *primers* específicos para cada tipo a ser pesquisado. Conseqüentemente, a utilização desta metodologia resulta em aumento do tempo e do custo para identificação dos tipos virais específicos. Além do mais, *primers* do tipo específico não estão disponíveis para todos os HPV (Didelot-Rousseau et al., 2006). Outro ensaio da PCR é com o uso de *primers* de consenso, o que permite a detecção de um número maior de tipos em uma única reação, uma vez que um par de *primers* é direcionado a uma região conservada do gene L1 usada para classificação formal dos diferentes tipos de HPV (Dehn et al., 2007). Existem diferentes *primers* de consenso disponíveis no mercado que se diferenciam, principalmente pelo número de pares de base amplificados, capacidade em detectar infecções com múltiplos tipos e capacidade de amplificação de acordo com integridade do DNA da amostra biológica.

O par de *primers* GP5+/6+ amplifica um fragmento de 150 pares de base (de Roda Husman et al., 1995; Jacobs et al., 1997); com um espectro maior para a identificação de diferentes tipos de HPV, os *primers* degenerados MY09/11 identificam um fragmento de 450 pares de base (Bosch et al., 1995). A versão redelineada do MY09/11 para aumentar a sensibilidade e reprodutibilidade de amplificação de um espectro de tipos virais, o PGMY09/11 (Gravitt et al., 2000),

e um outro par de *primers*, o SPF (Ketler et al., 1999) amplifica um fragmento de 65 pares de base, possibilita um aumento substancial na identificação de tipos específicos de amostras infectadas com múltiplos tipos de HPV. A eficiência da PCR é inversamente proporcional ao produto amplificado. *Primers* que amplificam fragmentos menores são considerados mais sensíveis e adequados para amostras com DNA menos preservado (Villa e Denny, 2006).

A determinação do tipo de HPV do produto amplificado pela PCR pode ser feita através de métodos como *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), seqüenciamento e hibridização do ácido nucléico. Na técnica de *RFLP* a detecção do HPV é feita por digestão do produto de PCR com enzimas de restrição, cujos fragmentos são analisados por eletroforese, com um padrão de banda específico para cada tipo de HPV. É um método manual e trabalhoso, de interpretação direta que não permite a identificação dos tipos presentes na amostra clínica com infecção por diversos tipos de HPV (Molijn et al., 2005).

O seqüenciamento é o único procedimento capaz de genotipar todos os tipos de HPV e variantes, após a análise da seqüência de nucleotídeos da amostra e comparação com seqüências existentes no banco de dados da *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) através do programa *Basic Local Alignment and Search Tool* (BLAST). A desvantagem deste método é que é trabalhoso e requer equipamento de alto custo e também não consegue identificar alguns tipos quando existe infecção por múltiplos tipos (Villa e Denny, 2006).

Mais recentemente, métodos de hibridização do ácido nucléico, como os de hibridização reversa, foram desenvolvidos pela indústria com o objetivo de detectar infecções por tipo específico e múltiplos tipos em uma mesma amostra a partir de um único passo. Nesta reação, ocorre a hibridização simultânea do produto de PCR com sondas múltiplas que estão imobilizadas em fita de nylon ou nitrocelulose em linhas paralelas em posições definidas. A hibridização em uma linha específica determina o tipo de HPV. O ensaio depende de uma reação colorimétrica e da comparação da posição da linha resultante com a fita modelo do fabricante.

Testes para genotipagem rápidos, baratos e eficazes são hoje necessários para estudos epidemiológicos e clínicos, e para isso vários *kits* comerciais podem ser apropriados. Esses *kits* variam na sua sensibilidade, hibridização cruzada e falhas em detectar certos tipos ou variantes.

Atualmente os laboratórios Roche disponibilizam o *Linear Array® HPV genotyping test* (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ), referido como LA-HPV um sistema de detecção e genotipagem, comercializado na Europa para diagnóstico *in vitro* e de uso exclusivo para pesquisa nos Estados Unidos da América do Norte e também no Brasil. Os reagentes do LA-HPV foram desenhados para otimizar a sensibilidade e reprodutibilidade do teste, sendo capaz de identificar 37 tipos de HPV através da amplificação da sequência L1 do vírus presente nas células cervicais com o uso dos *primers* biotinilados, PGMY09/PGMY11. Além disso, permite a co-amplificação do gene da beta-globina humana e hibridização

com probes de baixa e alta sensibilidade, possibilitando um monitoramento ideal da amplificação de cada amostra (Dunn et al., 2007).

Diversos grupos (Castle et al., 2006; Coutlée et al., 2006; Giuliani et al., 2006; Stevens et al. 2007; Woo et al., 2007) têm considerado o teste LA-HPV de alta acurácia e aplicabilidade na detecção e genotipagem do HPV em amostras clínicas, possibilitando a obtenção de informações sobre a distribuição dos genótipos e presença de infecção múltipla nessas amostras.

O melhor conhecimento dos padrões de infecção por tipos específicos de HPV pode significar um avanço na compreensão da história natural da infecção e sua relação com lesões neoplásicas escamosas intra-epiteliais. Além disto, propiciar o conhecimento do perfil epidemiológico das infecções por HPV nas diferentes lesões histologicamente diagnosticadas é de fundamental importância. Por outro lado, conhecer a distribuição dos tipos de HPV mais prevalentes em mulheres com NIC2 e NIC3 na Região Sudeste gera informações que serão fundamentais no controle e prevenção desta infecção, principalmente no contexto dos tipos incluídos na vacina.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Detectar e identificar os tipos específicos de HPV em amostras de raspado de colo uterino de mulheres com NIC 2 e 3.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a prevalência geral de 37 tipos de HPV de alto e baixo risco oncogênico nessas mulheres por meio da técnica de *Linear Array*.
- Identificar e comparar o tipo de HPV mais prevalente nas lesões compatíveis com NIC 2 e NIC 3.
- Determinar e comparar a presença de infecções com múltiplos tipos de HPV nas lesões compatíveis com NIC 2 e NIC 3.
- Identificar e comparar os tipos de HPV filogeneticamente associados às espécies Alfa 9 e Alfa 7 nas lesões compatíveis com NIC 2 e NIC 3.

3. Publicação

International Journal of Gynecological Cancer

*International Journal of
Gynecological Cancer*

Relation of HPV genotype and phylogenetic classification with the severity of cervical intraepithelial neoplasia in Brazilian women

Journal:	<i>International Journal of Gynecological Cancer</i>
Manuscript ID:	IJGC-2007-00876
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	02-Jan-2008
Complete List of Authors:	Pitta, Denise; Universidade Estadual de Campinas, Obstetrics and Gynecology Sarian, Luis; Universidade Estadual de Campinas, Obstetrics and Gynecology Campos, Elisabete; Universidade Estadual de Campinas, Obstetrics and Gynecology Rabelo, Silvia; Universidade Estadual de Campinas, Obstetrics and Gynecology Syrjänen, Kari; Turku University Hospital, Oncology & Radiotherapy Derchain, Sophie; Universidade Estadual de Campinas, Obstetrics and Gynecology
Keywords:	genotyping, multiple infections, linear array, HPV

 scholarONE™
Manuscript Central

Relation of HPV genotype and phylogenetic classification with the severity of cervical intraepithelial neoplasia in Brazilian women

Denise R. Pitta^a, Luis Otávio Sarian^a, Elisabete A. Campos^a, Sílvia H. Rabelo-Santos^b,
Kari Syrjänen^c and Sophie F. Derchain^a

(a) Department of Obstetrics and Gynecology, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), São Paulo, Brasil;

(b) School of Pharmacy, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Brasil;

(c) Department of Oncology & Radiotherapy, Turku University Hospital, Turku, Finland

Corresponding author:

Sophie F. Derchain

Rua Dr Antonio Hossri, 629

13083-370, Campinas, SP, Brazil

Fone/FAX-55-19-35219305

e-mail: derchain@fcm.unicamp.br

Abstract

Objective: to evaluate the distribution of single and multiple infections of different HPV types in women with high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2 and CIN3) and to assess the relation of the various combinations of virus with the severity of CIN. **Subjects and methods:** Cervical samples from 106 women treated due to CIN2 (18) or CIN3 (88) were examined for specific HPV genotypes using Roche Linear Array® (LA-HPV)(Roche Diagnostics, USA). The material was collected immediately before cervical conization. The proportion of CIN2 and CIN3 in groups of women infected with varying HPV phylogenetic groups A7 and A9 was compared. Three situations were considered: women with 1) single infections; 2) multiple infections; 3) the whole sample. The proportions of CIN2 and CIN3 in groups of women with different combinations of HPV types were compared. **Results:** Multiple infections were detected in 68 (64.7%) samples. The most frequent high-risk genotypes detected (single/multiple) were HPV16 (57.1%), HPV58 (24.7%), HPV33 (15.2%), HPV52 (13.3%), HPV 31 (10.4%), HPV51 (7.6%) and HPV18 (6.6%). Women devoid of infection with HPV species Alpha 9 were less likely to have CIN3 as compared to their Alpha 9 HPV-infected counterparts. HPV16 and/or HPV18, associated or not with other viral types, were more frequently found in specimens of women with CIN3 than in those of women with CIN2. **Conclusions:** the severity of high-grade CIN may be aggravated by the presence of HPV types included in the Alpha 9 phylogenetic classification and by infections including HPV16 and 18 combined or not with other HPV genotypes.

Key words: HPV, genotyping, multiple infections, linear array

Introduction

Persistent infection with high-risk types of human papillomavirus (HPV) is known to be a unifying risk factor for the development of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and invasive carcinoma ^(1,2,3,4). CIN is classified into three grades, based on the progressive extension of the atypical cells from the proliferative layers to the full thickness of the epithelium ⁽⁵⁾. Although CIN 2 and CIN 3 represent high-grade lesions of the cervix, they are heterogeneous in their potential for progression to invasive cancer ⁽⁶⁾.

Current evidence implicates that differences in HPV types may correlate with the biological potential and risk for invasion of CIN lesions ^(2,7,8). Recent data show that HPV types found in CIN 2 are different from those observed in CIN 3, CIN 2 frequently containing HPV types that are not commonly found as single types in invasive cancers ⁽⁹⁾. This could suggest that invasive cancer is unlikely to be the end point for such CIN lesions ^(10,9).

Genital human papillomavirus are classified as genus Alpha-papillomavirus. The species within these genres are closely related in terms of phylogenesis, being that in spite of having distinct genomic sequences, they show identical or very similar biological or pathological properties. The species 9 lumps with the type species HPV 16, the HPV types HPV-31, 33, 35, 52, 58 and 67. The species 7 lumps with the type species HPV 18, the HPV types HPV-39, 45, 59, 68, 70 and 85 ⁽¹¹⁾.

Controversies exist regarding a possible competition or synergy of individual types in multiple infections. Some natural history studies suggest an increased risk of acquisition of new HPV types in women already infected, as

compared with those who are HPV-negative ^(12,13). An alternative interpretation of these findings might be that more than one HPV type is transmitted simultaneously, and their sequential detection could be a consequence of replicate life cycles that are asynchronous and only occasionally overlapping ⁽¹⁴⁾. These life cycles might be interdependent ⁽¹⁵⁾. Multiple HPV types may be associated with a risk of progression that exceeds that due to single-type infections. In a recent study, there was evidence that this risk increased with the cumulative number of HPV types, in most combinations, and these associations seemed particularly strong in a short term ⁽¹⁶⁾.

In this report, we address the question of heterogeneity of HPV types as a possible source of biological variation in CIN 2 and CIN 3. To add new information to the growing body of literature in women with these lesions we aimed to evaluate the distribution of single and multiple infections of different HPV types in women with high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN 2 and CIN 3) and to compare the prevalence of different HPV types in CIN 2 and CIN 3, in view of the phylogenetic classification of the virus.

Subjects and methods

PATIENTS AND EXAMINATION PROCEDURES

The material of this cross-sectional study comprises 106 non-consecutive women that underwent large loop excision of transformation zone (LLETZ) to treat CIN 2 or 3, between February 2001 and April 2004. All women had been

referred to the colposcopy clinics of Campinas State University, Brazil, due to HSIL (high grade squamous intraepithelial lesions) in their Pap smears. At the pre-treatment visit, all women were interviewed regarding their clinical, social and demographic data. A complete gynecological examination was performed, with collection of endocervical specimens for HPV testing, followed by colposcopic examination of the cervix. The decision to perform diathermic conization was based on the referral cytology and clinical/colposcopic configuration of the cervix. The study was approved by the local Ethics Committee, and all patients signed an Informed Consent prior to enrollment.

Histology

Histological samples consisted of 106 diathermic conization specimens. This material was fixed in 10% phosphate buffered formalin, embedded in paraffin, and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Samples for histology were analyzed according to the World Health Organization's criteria ⁽¹⁷⁾. In the present series, only cases rendered as CIN 2 or CIN 3 were included. Mean age of the patients was 34.08 years (90% central range 17.5 to 73.6 years), being similar for women with CIN 2 (mean 32.01 years - 90% central range 17.4 to 59.5 years) and CIN 3 (mean 34.05 years - 90 % central range 17.4 to 59.5 years).

HPV DETECTION

DNA extraction

For HPV typing, cervical cells were collected using Digene™ cervix brush and then agitated in universal collection medium (UCM). An aliquot of 200ul of UCM was sampled (Digene Corporation, USA) and centrifuged at 13,000x g for 10 min. The supernatant was removed and the cellular pellet stocked at -20°C until further use. The cells in the pellet were re-suspended in 200µl of solution of digestion (Tris 1mM, 200ug/ml of Proteinase K, 0,5% SDS) by shaken and incubated at 55°C, 2 hours and 95°C, 5 minutes. After that, 200ul of solution phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) was added and shaken vigorously before centrifugation at 5000x g for 10 min. The water phase was removed and transferred to a clean tube, and 1/10 of Na AC 3M pH 5,2 was added and mixed. The 2,5 volumes of 70% ice-cold ethanol was added and shaken. The solution was centrifuged at 15,000x g for 15 min, supernatant was removed and after the pellet of DNA was dry, it was dissolved in 100ul of TE solution (Tris 1mM, Edta 100uM, pH 8.2). Nucleic acids were stored at -20°C until use.

Roche Linear Array®

The Roche Linear Array® (LA-HPV) genotyping assay (Roche Molecular Systems, Alameda, CA, USA) is based on PCR amplification of target DNA using HPV primers (PYGM09/11), hybridization of the amplified product with oligonucleotide probes and their detection by colorimetric reaction. The master

mix contains primers for the amplification of a 450bp fragment of the L1 region of more than 37 HPV genotypes ⁽¹⁸⁾ and 268bp fragment of the human β -globin gene, as an internal control. The detection and genotype determination was performed using the denatured amplified DNA and array of oligonucleotide probes, located in the polymorphic region of L1 that permitted independent identification of individual 37 HPV genotypes (Figure 1): 16 high-risk HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82), 11 low-risk HPV (6, 11, 40, 42, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108, 67), 2 intermediate risk HPV (26, 53) and 8 of undetermined risk HPV (55, 62, 64, 69, 71, 83, 84, IS39).

Statistical analysis

Data were tabulated in OpenOffice spreadsheets and analyzed with the R environment for statistical analyses. The proportion of CIN 2 and CIN 3 in groups of women infected with varying HPV phylogenetic groups A7 and A9 was compared using Fisher's exact tests. Three situations were considered: women with 1) single infections; 2) multiple infections; 3) the whole sample. Then, a linear regression model was fit to assess the proportions of CIN 2 and CIN 3 in groups of women with different single or multiple combinations of infecting HPV types.

Results

The distribution of HPV types as single and multiple infections is shown in Table 1. Of the 37 HPV types included in LA-HPV, 32 were detected in the studied samples. The HPV 16 was the most prevalent genotype (present in 57.1% of the samples), either as single infection or co-infecting the cervix together with other HPV types. HPV16 was the only infecting type in 15.2% of samples. Other frequent genotypes were HPV58 (26/105; 24.7%), HPV33 (16/105; 15.2%), HPV52 (14/105; 13.3%), HPV31 (11/105; 10.4%) and HPV51 (8/105; 7.6%), all being high-risk HPV types. HPV18 appears in only 6.6% of the lesions, and in none of them, HPV18 was the single agent. Only 3/105(2.87%) women had infections composed exclusively of low- and intermediate-risk HPV types (either single or multiple). The precise composition of the various multiple HPV infections is shown in Figure 1. Multiple infections were detected in 68/105 (64.7%) women. The majority of these multiple-type infections included two HPV types (39/68; 57.3%), and considerably less frequently three types (17/68; 25%), four types (8/68; 11.7%), five types (2/68; 2.9%) and even six types (2/68; 2.9%) (Figure 2). Among the multiple-type infections, 42/68 (61.7%) consisted exclusively of high-risk HPV types. The predominant multiple-type associations (Figure 3) were HPV 16/58 with or without other types (n=14), followed by HPV 16/52 with or without other types (n=8), HPV 16/18 (n=5) with or without other types, HPV 16/33 with or without other types (n=4), HPV 33/58 and HPV 35/52 with or without other types (n=2, of each).

The distribution of HPV types in accordance to their phylogenetic species (Genus Alpha, Species 7: HPV18, 39, 45, 59, 68, 70 and 85; and Genus Alpha, Species 9: HPV16, 31, 33, 35, 52, 58, and 67) in CIN 2 and CIN 3 lesions is depicted in Table 3. The majority of women had an HPV type of species Alpha 9 and others, and very few had Alpha 7 and others (5/105), followed by women with both species Alpha 9 and Alpha 7 (22/105). Proportionally, women not infected with HPV species Alpha 9 were less likely to have CIN 3 as compared to their Alpha 9 HPV-infected counterparts ($p=0.01$). This tendency was also found when analyzing the subset of women with multiple infections only ($p=0.001$). In women infected with a single HPV type, the proportion of CIN 3/CIN 2 was the same regardless of the HPV species present in their cervix ($p=0.20$).

The overall detection of HPV by LA was 105/106 women (99%); for CIN 2 (100%) and for CIN 3 (99%). HPV 16 and 18 single infections, HPV 16/18 co-infections, and HPV single or multiple infections without HPV16 and 18 are summarized in Table 4. Infections including HPV16 and 18 alone or in association with other HPV genotypes were significantly more common in CIN 3 than in CIN2 ($p=0.01$).

Discussion

In this study using Roche LA-HPV genotyping assay, HPV was detected in 99% of CIN 2 and CIN 3 samples. Similar results were reported by Castle et al.⁽¹⁹⁾ and Gargiulo et al.⁽²⁰⁾. LA-HPV is a commercial HPV test, manufactured under good manufacturing practices with standardized reagents⁽¹⁹⁾. In this

assay, the same amplicon can be directly used for both detection of β globin and 37 different HPV genotypes in a single reaction. In the present series, this method was easy to use and highly accurate for the detection of the majority of clinically significant HPV genotypes.

Unlike DNA sequencing, LA-HPV is capable of identifying multiple infections^(21,22). In the present series, 64.7% of the samples had multiple HPV genotypes. This high prevalence of multiple infections is evident in most of the studies using LA-HPV, varying from 49.7% to 79.0%^(20,21,22). Detection and genotyping of HPV becomes more complex in samples containing multiple genotypes, because of competition for reagents during amplification and discrimination of types amplified by PCR. The correlation between the numbers of additional types detected with LA-HPV suggests that less competition during amplification was encountered with LA-HPV⁽²³⁾.

One clear advantage of full HPV genotyping is the ability to increase the performance of screening programs using HPV, while identifying those HPV-positive women who have persistent oncogenic HPV. There is some recent evidence that the risk of developing the lesion increases with the cumulative number of HPV types, and these associations seemed particularly strong during the first year of follow-up⁽¹⁶⁾. Thus, detection of short-term HPV persistence may increase specificity of the screening based on HPV. If full genotyping is introduced into the screening, one can solve the question, how often do women who test repeatedly positive for oncogenic HPV, including or not HPV 16 and HPV 18, have a persistent oncogenic HPV infection⁽²⁴⁾.

In this series of Brazilian women, the overall prevalence of HPV16 was 57.1%, although HPV16 as a single type was present only in 15.2% of the cases. The associations most frequently found were with HPV16 together with HPV 58, 52, 18 and 33. In a study very similar in terms of design compared to the present one, Prétet et al.⁽²⁵⁾, examining a sample of CIN 2 and 3, detected HPV16 as the most frequent type. However, contrasting to the present findings, that type was the single agent in 40.4% of the samples. In a recent meta-analysis, Smith et al.⁽⁸⁾ found a 45.3% prevalence of HPV16 (both single and co-infections) in high-grade lesions collected from all around the world.

In our study, HPV18 genotype appears in the seventh position in terms of prevalence, having been detected in 6.6% of the samples. Invariably, HPV18 was associated with other HPV genotypes. This is very similar to the report of Prétet et al.⁽²⁵⁾, with HPV18 prevalence of 4.3% (6.6% of 121 CIN 2 lesions and 3.5% of 372 CIN 3 lesions) and only 3 CIN 3 lesions with HPV18 as the single-type infection. In the report of Smith et al.⁽⁸⁾, HPV18 appears in the fifth position with an overall prevalence of 6.9%. There are some minor differences between this meta-analysis⁽⁸⁾ and our results, regarding the order of prevalence of the most common HPV genotypes; 16, 31, 33, 58, 18, 52, 35 and 51 in this meta-analysis, and 16, 58, 33, 52, 31, 51, 18 and 68 in the present series. However, these authors state that there was an important lack of South American data in their meta-analysis, and our present study adds new information concerning the HPV type distribution in high-grade lesions among Brazilian women.

Comparing CIN 2 and CIN 3, HPV16 and 18 were significantly more prevalent in CIN 3 lesions (Table 4). This is consistent with the data of Prétet et al.⁽²⁵⁾, who analysed 121 CIN 2 and 372 CIN 3 lesions in France, and also found a higher prevalence of HPV16 in CIN 3 (64.2%) as compared to that in CIN 2 lesions (56.2%). This difference was even more marked in a study of Zuna et al.⁽⁹⁾, reporting HPV16 infections in 65.6% of CIN 3 and only 19.0% in CIN 2 lesions. Despite the fact that in all reported series, CIN 2 lesions represented a minority of cases, these data suggest that CIN 2 and 3 might differ in their biological potential, and that HPV genotypes might interfere with the risk of progression among these two categories of CIN lesions.

According to the results of the present study, women infected with Alpha 9 species were more likely to have CIN 3 when compared to women infected with Alpha 7 species and others. These data are compatible with the information on the carcinogenic potential of specific HPV types. In fact, studies have demonstrated that HPV16, 18 and 45 are more prevalent in squamous cell carcinoma than in HSIL (CIN 2 and CIN 3), whereas the reverse is true for other oncogenic types including HPV31, 33, 52 and 58. Infection with HPV16 imposes the highest risk for both CIN 3 and cervical carcinoma, although HPV33, which also belongs to Alpha 9 species, possibly has a greater oncogenic potential compared to HPV18 and 45⁽⁷⁾. In another epidemiological study, Wheeler et al.⁽²⁶⁾ observed a higher risk of CIN 3 in women with HPV31 (Alpha 9) and relatively low oncogenic potential for HPV56 and 59 (Alpha 7).

To conclude, this study provides new information on the distribution of individual HPV genotypes and multiple infections, obtained using the Roche LA-HPV assay. In this series of CIN 2 and CIN 3 lesions, HPV16 was the single most prevalent genotype, but it was typically associated with other high-risk HPV types. These data suggest that a prophylactic vaccine against HPV16/18 has the potential to prevent approximately half of the high-grade lesions. For one of two candidate vaccines, Harper et al.⁽²⁷⁾ described that this proportion might be even increased, if cross-protection is achieved against some other high-risk HPV type, e.g. total protection against HPV45, partial protection against HPV31 and no protection against HPV33, 52 and 58. The full implications of this observation are difficult to define, however, because HPV45 was under-represented in our cohort, similarly as in the recent meta-analysis⁽⁸⁾. These data on HPV genotype distribution among different populations are of crucial importance while designing the second-generation prophylactic HPV vaccines in the near future. Also of relevance, future therapeutic HPV vaccines would have their beneficial potential increased if designed to treat HPV infections not restricted to HPV16 and 18. The best hypothetical scenario is the one in which vaccine constituents are chosen taking into consideration the epidemiological distribution of HPV types in the specific geographical regions where they are to be used.

Acknowledgments:

The authors acknowledge the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for Grants 04/09309-5. SD is researcher of the Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

1. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JL, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189(1):12-9.
2. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Câncer.* 2003;89(1):101-05.
3. Muñoz N, Bosch XF, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(6):518-27.
4. Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine.* 24S3 2006: s3/42-s3/51.
5. Baak JP, Kruse AJ, Robboy SJ, Jansen EA, van Diermen B, Skaland I. Dynamic behavioural interpretation of cervical intraepithelial neoplasia with molecular biomarkers. *J Clin Pathol.* 2006;59 (10):1017-28.
6. Syrjänen KJ, Syrjänen SM. Papillomavirus infections in human pathology. 2000.
7. Snijders PJ, Steenbergen RD, Heideman DA, Meijer CJ. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J Pathol.* 2006;208:152-164.

8. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Fransceschi S, Winer R, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007; 121(3):621-632.
9. Zuna RE, Allen RA, Moore WE, Lu Y, Mattu R, Dunn ST. Distribution of genotypes in 282 women with cervical lesions: evidence for three categories of intraepithelial lesions based on morphology and HPV type. *Mod Pathol*. 2007;20(2):167-74
10. Zuna RE, Allen RA, Moore WE, Mattu R, Dunn ST. Comparison of human papillomavirus genotypes in high grade squamous intraepithelial lesions and invasive cervical carcinoma: evidence of differences in biologic potential of precursor lesions. *Mod Pathol*. 2004;17(11):1314-22.
11. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HV, Zur Hausen H. Classification of papillomavirus. *Virology*. 2004;324(1):17-27.
12. Liaw KL, Hildesheim A, Burk RD, Gravitt P, Wacholder S, Manos MM. A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of others HPV types. *J Infect Dis*. 2001;183(1):8-15.
13. Rousseau MC, Pereira JS, Prado JC, Villa LL, Rohan TE, Franco EL. Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types as a predictor of acquisition and persistence of HPV infection. *J Infect Dis*. 2001;184(12):1508-1517.

14. Weissenborn SJ, Funke AM, Hellmich M, Mallmann P, Fuchs PG, Pfister HJ, Wieland U. Oncogenic human papillomavirus DNA loads in human immunodeficiency virus-positive women with high grade cervical lesions are strongly elevated. *J Clin Microbiol* 2003;41(6):2763-2767.
15. Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Rev Cancer*. 2007;7(1):11-22.
16. Trottier H, Mahmud S, Costa MC, Sobrinho JP, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, Franco EL. Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(7): 1274-80.
17. Scully RE, Bonfiglio TA, Kurman RJ, Silverberg SG, Wilkins EJ. Histological typing of female genital tract tumors. In: World Health Organization – International histological classification of tumors. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag; 1994.
18. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlee F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(1):357-61.
19. Castle PE, Sadorra M, Garcia F, Holladay EB, Kornegay J. Pilot study of a commercialized human papillomavirus (HPV) genotyping assay: comparison of HPV risk group to cytology and histology. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(11):3915-17.

20. Gargiulo F, De Francesco MA, Schreiber C, Ciravolo G, Salinaro F, Valloncini B, Manca N. Prevalence and distribution of single and multiple HPV infections in cytologically abnormal cervical samples from Italian women. *Virus Res.* 2007; 125(2):176-182.
21. Giuliani L, Coletti A, Syrjänen K, Favalli C, Ciotti M. Comparison of DNA sequencing and Roche Linear Array in human papillomavirus (HPV) genotyping. *Anticancer Res.* 2006; 26(5B):3939-41.
22. Woo YL, Damay I, Stanley M, Crawford R, Sterling J. The use of HPV linear array assay for multiple HPV typing on archival frozen tissue and DNA specimens. *J Virol Methods.* 2007;142(1-2):226-30.
23. Coutlee F, Rouleau D, Petignat P, Ghattas G, Kornegay JR, Schlag P, et al. Enhanced detection and typing of human papillomavirus (HPV) DNA in anogenital samples with PGMV primers and the Linear Array HPV genotyping test. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(6):1998-2006.
24. Meijer CJ, Snijders PJ, Castle PE. Clinical utility of HPV genotyping. *Gynecol Oncol.* 2006; 103(1):12-17.
25. Prétet JL, Jacquard AC, Carcopino X, Monnier-Benoit S, Averous G, Soubeyrand B, et al. Human papillomavirus genotype distribution in high grade cervical lesions (CIN 2/3) in France: EDITH study. *Int J Cancer.* 2007;24 Sep published online.

26. Wheeler CM, Hunt WC, Schiffman M, Castle PE, Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study Group. Human papillomavirus genotypes and the cumulative 2-year risk of cervical precancer. *J Infect Dis.* 2006;194(9):1291-1299.
27. Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B, Roteli-Martins CM, Jenkins D, Schuind A, Costa Clemens SA, Dubin G. Sustained efficacy up to 4-5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomized control trial. *Lancet* 2006;367:1247-55.

Table 1. Distribution of HPV genotypes in single and multiple infections

HPV genotype	Overall prevalence of HPV genotypes (single and multiple infections) n(%)	Single infections only n (%)
High risk		
16	60 (57.1)	16 (15.2)
58	26 (24.7)	6 (5.7)
33	16 (15.2)	4 (3.8)
52	14 (13.3)	1 (0.9)
31	11 (10.4)	2 (1.9)
51	8 (7.6)	1 (0.9)
18	7 (6.6)	0
68	7 (6.6)	0
35	6 (5.7)	1 (0.9)
45	5 (4.7)	0
56	4 (3.8)	1 (0.9)
39	3 (2.8)	0
59	3 (2.8)	0
66	3 (2.8)	1 (0.9)
82	3 (2.8)	0
73	2 (1.9)	0
Intermediate risk		
53	2 (1.9)	0
26	0	0
Low risk		
70	5 (4.7)	1 (0.9)
CP6108	5 (4.7)	0
61	4 (3.8)	0
67	3 (2.8)	0
81	3 (2.8)	0
54	2 (1.9)	0
6	2 (1.9)	1 (0.9)
11	1 (0.9)	1 (0.9)
40	1 (0.9)	0
42	1 (0.9)	0
72	1 (0.9)	0
Not classified		
71	5 (4.7)	0
55	2 (1.9)	0
62	2 (1.9)	0
84	2 (1.9)	0
64	0	0
69	0	0
83	0	0
IS39	0	0

Table 2. Distribution of HPV Genus A, Species 7 and 9 genotypes in CIN 2 and CIN3

Species in sample	Single n(%)		Multiple n(%)		Total n(%)	
	CIN 2	CIN 3	CIN 2	CIN 3	CIN 2	CIN 3
A9 and others (except A7)	1 (20)	29 (88)	8 (61)	34 (62)	9 (50)	63 (72)
A7 and others (except A9)	2 (40)	0	1 (8)	2 (4)	3 (17)	2 (2)
A9 and A7	0	0	3 (23)	19 (34)	3 (17)	19 (22)
Only others	2 (40)	4 (12)	1 (8)	0	3 (17)	4 (4)
Total	5 (100)	33 (100)	13 (100)	55 (100)	18 (100)	88 (100)
	p=0.20		P=0.001		p=0.01	

(A9 including 16, 31, 33, 35, 52, 58 and 67); (A9 including 18, 39, 45, 59, 68, 70 and 85)

* One CIN 3 HPV was HPV negative by LA

Comparing CIN 2 and CIN 3 and infection including A7 or A9; p=0.01

Table 3. Occurrence of HPV16 and HPV18 in CIN 2 and CIN 3 lesions

HPV Infection	Histological Grade	
	CIN 2 n(%)	CIN 3 n(%)
Multiple infections including HPV 16 and/or 18	6 (33)	40 (45)
Single infections including HPV 16 and/or 18	0	16 (19)
Multiple infections neither including HPV 16 nor 18	7 (39)	15 (17)
Single infections neither including HPV 16 nor 18	5 (27)	16 (19)
Total	18 (100)	87 (100)

* One CIN 3 HPV was HPV negative by LA

Comparing CIN 2 and CIN 3 and infection including HPV 16 and 18; p=0.01

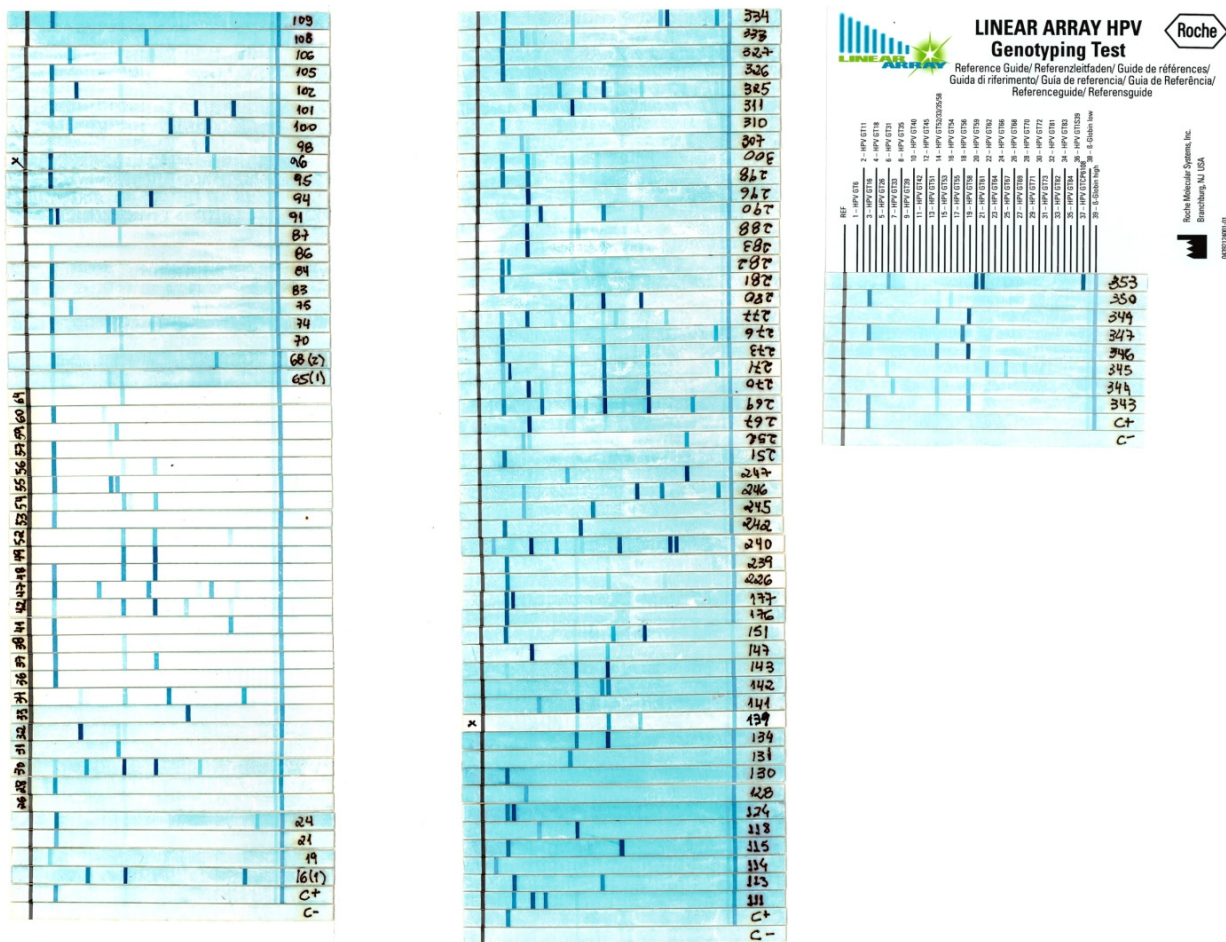


Figure 1. Linear array strips of all cases lined with the reference card

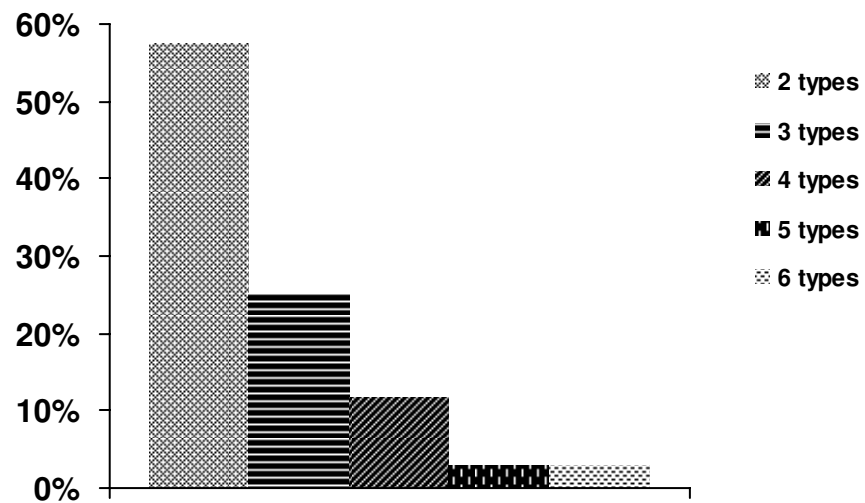
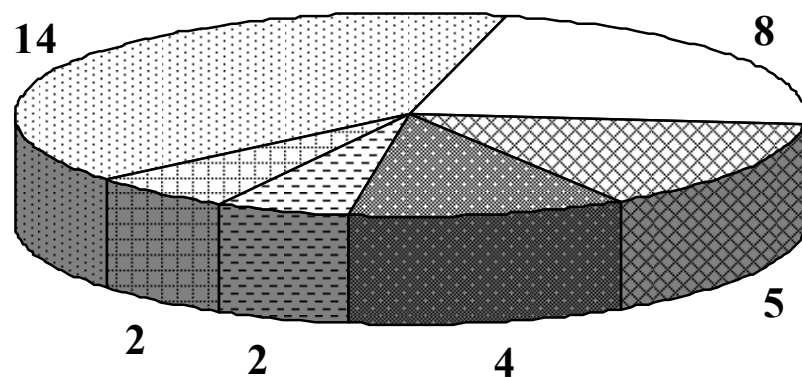


Figure 2. Number of types involved in multiple infections



- 16-58 with or without others types
- 16-52 with or without others types
- 16-18 with or without others types
- 16-33 with or without others types
- 33-58 with or without others types
- 35-52 with or without others types

Figure 3. Most prevalent associations of HPV types in multiple infections

4. Conclusões

- O teste LA-HPV detectou infecção por HPV em 99% dos casos, sendo que 64,7% foram de infecção múltipla.
- Os genótipos de alto risco mais frequentes detectados em infecções únicas ou múltiplas foram HPV 16 (57,1%), HPV 58 (24,7%), HPV 33 (15,2%), HPV 52 (13,3%), HPV 31 (10,4%), HPV 51 (7,6%) e HPV 18 (6,6%).
- Lesões do tipo NIC3 foram mais infectadas por HPV incluídos na classificação filogenética A9.
- HPV 16 e 18 associado ou não com outros tipos de HPV foram mais prevalentes nas lesões do tipo NIC3.

5. Referências Bibliográficas

Baseman JG and Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. **J Clin Virol** 2005; 32(1):16-24.

Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. **J Natl Cancer Inst** 1995;87:796–802.

Bosch FX, Sanjose S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality. **J Natl Cancer Inst Monogr.** 2003;(31):3-13.

Castle PE, Sadorra M, Garcia F, Holladay EB, Kornegay J. Pilot study of a commercialized human papillomavirus (HPV) genotyping assay: comparison of HPV risk group to cytology and histology. **J Clin Microbiol** 2006; 44(11):3915-7.

Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2005;14(5):1157-64.

Coutlee F, Rouleau D, Petignat P, Ghattas G, Kornegay JR, Schlag P, et al. Enhanced detection and typing of human papillomavirus (HPV) DNA in anogenital samples with PGMY primers and the Linear Array HPV genotyping test. **J Clin Microbiol** 2006; 44(6):1998-2006.

Dehn D, Torkko KC, Shroyer KR. Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. **Cancer Cytopathol** 2007;111(1):1-14.

de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJC, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by polymerase chain reaction. **J Gen Virol** 1995; 76:1057-62.

de Sanjosé S, Diaz M, Catellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology:a meta-analysis. **Lancet** 2007;7:453-459

Didelot-Rousseau MN, Courgnaud V, Nagot N, Ouedraogo A, Konate I, Mayaud P, et al. Comparison of Inno-Lipa HPV genotyping v2 with PCR product subcloning and sequencing for identification of genital human papillomavirus genotypes in african women. **J Virol Met** 2006 ;135 :181-5.

Dunn TS, Allen RA, Wang S, Walker J, Schiffman M. DNA extraction : an understudied and important aspect of HPV genotyping using PCR-based methods. **J Virol Meth** 2007 ;143(1) :45-54.

Gillio-Tos A, De Marco L, Ghisetti V, Snijders PJF, Segnan, Ronco G, et al. Human papillomavirus typing with GP5+/6+ polymerase chain reaction reverse line blotting and with commercial type-specific PCR kits. **J Clin Virol** 2006;36:126-32.

Giuliani L, Coletti A, Syrjänen K, Favalli C, Ciotti M. Comparison of DNA sequencing and Roche Linear Array® in human papillomavirus (HPV) genotyping. **Anticancer Res** 2006;26:3939-41.

Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. **J Clin Microbiol** 2000;38(1):357-61.

Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. **Arch Pathol Lab Med** 2003;127:940-5.

Iftner T, Villa LL. Human papillomavirus technologies. **J Natl Cancer Inst Mono** 2003;31:80-8.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em www.inca.gov.br. Acessado em 12/12/2007

Jacobs MV, Snijders PJ, van den Brule AJ, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Walboomers JM. A general primer GP5+/GP6+ mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. **J Clin Microbiol** 1997;35(3):791-5

Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L, Molijn A, Sastrowijoto S, ter Schegget J, et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. **J Clin Microbiol** 1999;37:2508-17.

Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. **J Clin Invest** 2006; 116(5): 1167-73.

Liaw KL, Hildesheim A, Burk RD, Gravitt P, Wacholder S, Manos MM. A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of others HPV types. **J Infect Dis** 2001;183:8-15.

- Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. **J Clin Virol** 2005;32(1):43-51.
- Prétet JL, Jacquard AC, Carcopino X, Monnier-Benoit S, Averous G, Soubeyrand B, et al. Human papillomavirus genotype distribution in high grade cervical lesions (CIN 2/3) in France: edith study. **Int J Cancer** 2007;24 Sep published online.
- Rousseau MC, Pereira JS, Prado JC, Villa LL, Rohan TE, Franco EL. Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types as a predictor of acquisition and persistence of HPV infection. **J Infect Dis** 2001;184:1508-17.
- Smith JS, Lindsay L, Hoots J, Keys J, Fransceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. **Int J Cancer** 2007; 121:621-32.
- Snijders PJ, Steenbergen RD, Heideman DA, Meijer CJ. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. **J Pathol** 2006;208:152-64.
- Stevens MP, Garland SM, Rudland E, Tan J, Quinn MA, Tabrizi SN. Comparison of the Digene Hybrid Capture 2 assay and Roche Amplicor and Linear Array human papillomavirus (HPV) tests in detecting high-risk hpv genotypes in specimens from women with previous abnormal pap smear results. **J Clin Microbiol** 2007;45 (7):2130-7.
- Trottier H, Mahmud S, Costa MC, Sobrinho JP, Duarte-Franco E, Rohan TE, et al. Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2006;15(7): 1274-80.
- van den Brule AJ, Pol R, Fransen-Daalmeijer N, Schouls LM, Meijer CJ, Snijders PJ. GP5+/6+-PCR followed by reverse line blot analysis enabled rapid and high throughput identification of human papillomavirus genotypes. **J Clin Microbiol** 2002; 40: 779–87.

Villa LL, Denny L. Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. **Int J Gynecol Obstet** 2006; 94(1):571-80.

Weissenborn SJ, Funke AM, Hellmich M, Mallmann P, Fuchs PG, Pfister HJ, et al. Oncogenic human papillomavirus DNA loads in human immunodeficiency virus-positive women with high grade cervical lesions are strongly elevated. **J Clin Microbiol** 2003;41:2763-7.

Wheeler CM, Hunt WC, Schiffman M, Castle PE. Human papillomavirus genotypes and the cumulative 2-year risk of cervical precancer. **J Infect Dis** 2006;194:1291-9.

Woo YL, Damay I, Stanley M, Crawford R, Sterling J. The use of HPV Linear Array assay for multiple HPV typing on archival frozen tissue and DNA specimens. **J Virol Methods** 2007;142:226-30.

Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Rev. Cancer** 2007;7:11-22.

Zuna RE, Allen RA, Moore WE, Lu Y, Mattu R, Dunn ST. Distribution of genotypes in 282 women with cervical lesions:evidence for three categories of intraepithelial lesions based on morphology and HPV type. **Mod Pathol** 2007;20:167-74.

6. Anexos

6.1. Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

PERSISTÊNCIA DO DNA-HPV APÓS A CONIZAÇÃO COM CIRURGIA DE ALTA FREQUÊNCIA (CAF) EM MULHERES COM NIC 2 OU 3

Eu, Sra _____, portadora do RG _____, atendida no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) no ambulatório de Patologia Cervical, participo da pesquisa “Persistência do DNA-HPV após a Conização com Cirurgia de Alta Frequência (CAF) em mulheres com NIC 2 ou 3”. Fui convidada a participar de uma continuação desta pesquisa que será realizada com o material que eu já coletei antes (aquela que identifica o vírus). Sei que este estudo tem como objetivo avaliar a presença do HPV de alto risco oncológico no meu colo uterino antes e após a conização por cirurgia de alta frequência. O exame que foi feito antes identificou se tinha vírus ou não e este novo teste, chamado PCR irá determinar o tipo específico de vírus eventualmente presente no material que eu já coletei.

Fui esclarecida quanto ao meu direito de não participar da pesquisa e a não aceitação na participação no estudo não implicará na perda dos direitos iniciais rotineiramente oferecidos pelo ambulatório. Sei também que a qualquer momento

posso desistir de participar da pesquisa, sem nenhum dano para a minha saúde e tratamento. Também fui informada de que não terei custos para participar da pesquisa, pois, o intervalo entre as consultas será o mesmo realizado de rotina no ambulatório. Sei que todas as informações pessoais serão avaliadas somente pelo médico que me atendeu e que as fichas ficarão de posse do(s) Doutore(s) responsáveis pela pesquisa, Doutora Sophie Françoise Mauricette Derchain e Dr. Luis Otávio Zanatta Sarian, que manterão o sigilo da fonte destas informações. Em caso de dúvidas ou esclarecimento, tenho o direito de entrar em contato com os Drs. Luís Otávio Zanatta Sarian e Sophie F M Derchain, no telefone 3788-9305 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP no telefone 3788-8936.

Nome da paciente _____

Assinatura da paciente: _____

Campinas, _____ de _____ de 200____.

Nome do pesquisador _____

Assinatura do pesquisador: _____

Campinas, _____ de _____ de 200____.