

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

JEAN PHILIPPE GUIMARÃES SAUVÉ

**INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE *DEFB1* E
ASSOCIAÇÃO COM A SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO
E PROGRESSÃO DA LESÃO CAUSADAS
PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)**

RECIFE - PE

2012

JEAN PHILIPPE GUIMARÃES SAUVÉ

**INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE *DEFB1* E
ASSOCIAÇÃO COM A SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO
E PROGRESSÃO DA LESÃO CAUSADAS
PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Strito sensu do Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em
Genética.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Crovella

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza

Recife, PE

2012

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

S262i Sauv , Jean Philippe Guimarães

Investiga o de polimorfismos no gene DEFB1 e associa o com a susceptibilidade   infec o e progressão da lesão causadas pelo papilomavírus humano (HPV) / Jean Philippe Guimarães Sauv . – Recife: O Autor, 2012.

64 folhas: fig., tab.

Orientador: Sergio Crovella

Coorientador: Paulo Roberto Eleutério de Souza

Disserta o (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-gradua o em Genética, 2012.

Inclui bibliografia e anexos

1. Papilomavírus 2. Polimorfismo (Genética) I. Crovella, Sergio (orientador) II. Souza, Paulo Roberto Eleutério de (coorientador) III. Título.

616.911

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-154

JEAN PHILIPPE GUIMARÃES SAUVÉ

**INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE *DEFB1* E
ASSOCIAÇÃO COM A SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO
E PROGRESSÃO DA LESÃO CAUSADAS
PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)**

APROVADO EM ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA:

Presidente: Prof. Dr. Sergio Crovella, UFPE

1º Examinador: Profª Drª Paula Sandrin Garcia, UFPE

2º Examinador: Profª Drª Neide Santos, UFPE

3º Examinador: Prof. Dr. Rafael Guimarães, UFRPE

Recife, PE

2012

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, Jacques, Aninha, Juliana, Axel e Michèle por serem as pessoas maravilhosas que são, pela dedicação, apoio e compreensão em todos os momentos de minha vida e de minha formação. São os grandes responsáveis pelas minhas conquistas!

Aos grandes e preciosos amigos, presentes em todas as horas e circunstâncias, pelos momentos extraordinários por que passamos juntos durante todos estes anos. Vocês sabem quem são. A todos da Warcursed, irmãos de sangue, companheiros inseparáveis e
Renegades from Hell!

À Priscila, “Meu amor, minha vida, meu tudo... Razão do meu viver!” (risos), por me incentivar, apoiar, e me manter sempre no caminho certo. Para você, todo meu amor, todo meu carinho! O meu ainda dispara...

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sergio Crovella, pelos ensinamentos, pela amizade, pela confiança depositada em todos que o cercam, e por ser essa pessoa humilde, simples e sábia que é. Meus sinceros agradecimentos pela grande oportunidade!

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Paulo Roberto, o maior companheiro de trabalho que alguém poderia querer. Agradeço imensamente pelos ensinamentos sobre ciência e sobre a vida, contribuindo sempre para meu crescimento científico e pessoal.

À Ludovica Segat e toda a equipe responsável pelos sequenciamentos, que providenciaram insights e todo o suporte necessário para tornar esse trabalho possível.

Aos grandes companheiros do Laboratório de Genética, Bioquímica e Sequenciamento de DNA Profa. Tânia Falcão (UFRPE), Sérgio, Jamilly, Camilla e em especial Mayara Mansur, por estar sempre disposta a ensinar tudo que sabe, sendo a responsável por minha iniciação na Genética. Agradeço pelos momentos de descontração que todos tivemos e pelo companheirismo sempre presente.

Aos amigos do LIKA, Paula, Alessandra, Rafael, Lucas, Stephanye, Ronaldo, Nanda, Jaqueline, Nathália, Márcia, Heidi, Antonio, Anselmo, Andréia, Catarina, Karina, Fabrício, Felipe, Manu, Ravenna e Ronald, por toda a ajuda no meu crescimento como profissional e pelas contribuições sempre bem-humoradas para que este trabalho obtivesse bons resultados.

Às instituições LIKA, Aggeu Magalhães e UFRPE por proporcionarem toda a infraestrutura necessária para o trabalho, e a todos os funcionários do LIKA.

*“Fly on your way, like an eagle
Fly as high as the sun
On your way, like an eagle
Fly and touch the sun...”*

Fly as high as the sun

(Flight of Icarus – Iron Maiden)

RESUMO

O papilomavírus humano (HPV) é o principal agente etiológico de lesões malignas, a exemplo do câncer cervical e de suas lesões precursoras, as Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NICs). Investigamos se os polimorfismos de base única (SNPs) no gene da Beta-Defensina Humana 1 (*DEFB1*) poderiam estar associados à susceptibilidade à infecção e à progressão da lesão cervical provocadas por HPV de alto risco. Polimorfismos neste gene têm sido alvo de diversos estudos e revelaram ser de suma importância na susceptibilidade a diversas infecções. Neste estudo, os SNPs -52G/A, -44C/G e -20 G/A na região 5' UTR do gene *DEFB1* foram analisados através de sequenciamento, em um grupo de 160 pacientes do sexo feminino HPV positivas e 71 indivíduos saudáveis. As análises estatísticas foram feitas utilizando o Teste exato de Fisher e o Teste do Qui-quadrado. Os resultados indicam que o alelo -44G e o haplótipo ACA podem estar relacionados com a susceptibilidade à infecção pelo HPV de alto risco. Os resultados não apontam diferenças significativas nas frequências alélicas e genotípicas dos outros polimorfismos entre pacientes infectados com HPV de alto risco e indivíduos saudáveis. Também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas frequências alélicas e genotípicas nos pacientes HPV positivos quanto ao grau de lesão cervical.

Palavras-chave: HPV, Beta-Defensina, Polimorfismos, Imunidade Inata

ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) is the main etiological agent for development of cervical cancer and its precursor lesions, the cervical intraepithelial neoplasia (CINs). We investigated whether single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the human Beta-Defensin 1 gene (*DEFB1*) could be associated with susceptibility to infection and progression of cervical lesions caused by high-risk HPV. Polymorphisms in this gene have been the subject of several studies and proved to be extremely important in susceptibility to various infections. In this study, SNPs -52 G/A, -44 C/G and -20 G/A in the 5'UTR of *DEFB1* were analyzed by direct sequencing in a group of 160 HPV-positive female patients and 71 healthy individuals. Statistical analysis was performed using Fisher's exact Test and Chi-square. The results indicate that the -44G allele and haplotype ACA may be associated with susceptibility to infection caused by high-risk HPV. The results show no significant differences in allelic and genotypic frequencies of the other polymorphisms in patients infected with high-risk HPV and healthy individuals. We also found no statistically significant differences in allelic and genotypic frequencies in HPV-positive patients related to the progression of cervical lesion.

Key words: HPV, Beta-Defensin, Polimorphisms, Innate Immunity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág
Figura 1 – Imagem computadorizada de um modelo de capsídeo de HPV	18
Figura 2 – Apresentação esquemática do genoma do HPV	19
Figura 3 – Exames citológicos, histológicos e fotografias mostrando o avanço das lesões provocadas pelo HPV, resultando em câncer cervical	23
Figura 4 – Ciclo de infecção do HPV no epitélio estratificado	26
Figura 5 – Representação esquemática de um SNP	27
Figura 6 – Formação de haplótipos a partir dos SNPS em LD	27
Figura 7 – Beta-defensina humana 1	29
Figura 8 – Função antimicrobiana direta e imunorregulatória por defensinas	30
Figura 9 – Estrutura secundária da região 5' UTR do mRNA do gene <i>DEFB1</i>	32
Figura 10 – Etapas do sequenciamento e Eletroferograma, mostrando os picos correspondentes às bases	33
Figura 11 – Desenho de primers com a indicação das regiões de anelamento à sequência	38
Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com GelRed™ com o produto de PCR do gene <i>DEFB1</i> , com 407pb, comparado ao marcador Ladder 100pb	41
Figura 13 – Eletroferograma demonstrando os resultados obtidos através do procedimento de sequenciamento	42

LISTA DE TABELAS

	Pág
Tabela 1 – Cronologia dos principais eventos envolvidos no estudo do HPV e Câncer Cervical	14
Tabela 2 – Doenças e lesões ocasionadas pelo HPV e o tipo de HPV mais comum em cada caso	16
Tabela 3 – Principais atividades e funções das proteínas do HPV	19
Tabela 4 – Fatores de risco envolvidos na progressão ao câncer cervical e à infecção pelo HPV	20
Tabela 5 – Sequências dos <i>primers</i> utilizados para sequenciamento de SNPs do gene <i>DEFB1</i>	38
Tabela 6 – Idade Média em anos do grupo controle e do grupo de estudo estratificado em pacientes com grau de lesão LSIL e HSIL	40
Tabela 7 – Sequência Consenso utilizada para comparar com as sequências das amostras e obter os Genótipos do gene <i>DEFB1</i>	42
Tabela 8 – Frequências alélicas e genotípicas do gene <i>DEFB1</i> em pacientes HPV+ e no grupo controle saudável	43
Tabela 9 - Frequências alélicas e genotípicas do gene <i>DEFB1</i> em pacientes HPV+ com lesão de baixo grau (LSIL) e alto grau (HSIL)	45
Tabela 10 – Frequências dos haplótipos do gene <i>DEFB1</i> nos pacientes HPV+ e no grupo controle saudável	47
Tabela 11 – Frequências dos polimorfismos do gene <i>DEFB1</i> entre populações de diversas etnias	48

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Sigla	Inglês	Definição	Português
APC	<i>Antigen presenting cells</i>		Células apresentadoras de antígeno
CCR6	<i>CC chemokine receptor 6</i>		Receptor de quimiocina 6
CD	<i>Dendritic cells</i>		Células dendríticas
DNA	<i>Desoxirribonucleic acid</i>		Ácido desoxirribonucleico
HapMap	<i>International Haplotype Mapping Project</i>		Projeto Internacional de Mapeamento de Haplótipos
hBD-1	<i>Human Beta defensin 1</i>		Beta defensina 1 humana
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>		Vírus da imunodeficiência humana
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>		Sistema Antígeno Leucocitário Humano
HPV	<i>Human Papillomavirus</i>		Papilomavírus Humano
HSIL	<i>High-grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>		Lesão intraepitelial Escamosa de Alto grau
LSIL	<i>Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>		Lesão intraepitelial Escamosa de Baixo grau
LD	<i>Linkage disequilibrium</i>		Desequilíbrio de ligação
LCR	<i>Long control region</i>		Região controladora longa
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic acid</i>		Ácido Ribonucleico Mensageiro ou RNA mensageiro
ORF	<i>Open reading frame</i>		Fase de leitura aberta
PAMP	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>		Padrões moleculares associados a patógenos
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>		Reação em cadeia da polimerase
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>		Ácido ribonucleico
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>		Polimorfismo de base única
UTR	<i>Untranslated region</i>		Região não traduzida
WHO	<i>World Health Organization</i>		Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

	Pág
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1. PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)	14
2.1.1. HISTÓRICO	14
2.1.2. HPV NO BRASIL E NO MUNDO	17
2.1.3. ESTRUTURA E INFECÇÃO POR HPV	17
2.1.4. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO	21
2.2. NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL	22
2.3. MECANISMOS DE RESPOSTA IMUNE AO HPV	24
2.4. POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA (SNPs)	26
2.5. PROTEÍNA DA BETA-DEFENSINA HUMANA 1 (hBD-1)	28
2.6. SEQUENCIAMENTO	32
3. OBJETIVOS	34
3.1. Geral	34
3.2. Específicos	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1. População de Estudo	35
4.2. Critérios de inclusão	35
4.3. Critérios de exclusão	35
4.4. Extração de DNA das amostras clínicas	35
4.5. Detecção do HPV por PCR	35
4.6. Tipagem do HPV	36
4.7. Genotipagem do gene <i>DEFB1</i>	37
4.8. Escolha de <i>primers</i>	37
4.9. Análises estatísticas	39
5. RESULTADOS	40
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÃO	52
8. REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

Apesar de existirem estratégias eficazes para a prevenção do câncer de colo do útero, esta doença continua sendo um grave problema de saúde em todo o mundo. Com aproximadamente 500 mil casos novos por ano em todo o mundo e 230 mil óbitos, o câncer cervical é o segundo mais comum entre as mulheres, ficando atrás apenas do de mama. Para o ano de 2011, a estimativa do número de novos casos de câncer do colo do útero para o Brasil foi de 17.540, com risco estimado de 19 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2011).

A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) é bastante comum em mulheres e é considerado o fator de risco mais importante na etiopatogênese do câncer cervical e de suas lesões precursoras, as Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NICs). O carcinoma cervical está caracterizado por uma fase pré-maligna bem definida, em que o diagnóstico pode ser através dos exames citológico, colposcópico ou histopatológico do material cervical (INCA, 2011). As modificações epiteliais cervicais nas NICs representam um espectro de anormalidades histológicas, variando de NIC I a III (carcinoma *in situ*), carcinoma escamoso, adenocarcinoma *in situ* e adenocarcinoma (SELLORS & SANKARANARAYANAN, 2004).

Entretanto, a infecção pelo HPV não é suficiente para produzir a transformação neoplásica, cofatores são necessários para a expressão total da oncogenicidade. Diversas pesquisas sustentam a existência de uma associação entre a oncogênese e evolução neoplásica causada pelo Papilomavírus Humano ao sistema imunológico. Porém, ainda é necessário elucidar como e quais os mecanismos precisos que desencadeiam uma resposta imune eficiente contra as lesões relacionadas ao HPV. Tais mecanismos podem estar relacionados à ativação do sistema imunológico e/ou à composição genética do indivíduo (PINTO, TÚLIO & CRUZ, 2002).

Em indivíduos imunocompetentes, foi observado que o período de evolução entre uma lesão pré-invasiva e o câncer é maior, quando comparado a indivíduos imunossuprimidos (NICOLAU, 2000), e que a maioria das mulheres imunocompetentes consegue desenvolver uma resposta imune efetiva que evita o desenvolvimento do

carcinoma cervical (PEREYRA, GUERRA & VILLA, 2004).

Há evidências de que a imunidade local é mais importante e eficiente que a sistêmica para controlar a infecção pelo HPV e o desenvolvimento das NICs, pois pacientes com deficiência de imunidade celular apresentam uma maior sensibilidade para o desenvolvimento de lesões cervicais (PETRY *et al.*, 1994; ELLERBROCK *et al.*, 2000).

Acredita-se que mutações no gene *DEFB1*, codificante da Beta-Defensina 1 (hBD-1) que é um peptídeo antimicrobiano componente importante da imunidade inata, possam ser em parte responsáveis pelas diferentes respostas imunológicas dos indivíduos e assim possam melhor explicar a susceptibilidade à infecção de alto risco. O presente estudo avaliou a associação de SNPs da região 5' UTR do gene *DEFB1* na população da região metropolitana de João Pessoa-PB, como marcador genético de susceptibilidade à infecção pelo HPV de alto risco.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

2.1.1 HISTÓRICO

O virologista alemão Harald zur Hausen ofereceu uma contribuição maciça para o desenvolvimento das pesquisas focando a história da infecção pelo HPV. Este, junto com outros pesquisadores, começou a sugerir e analisar o possível papel do HPV no câncer cervical entre os anos 1974 e 1976 (zur HAUSEN, 2002; BURD, 2003). De fato os primeiros tipos virais foram apenas isolados e posteriormente clonados diretamente de biópsias de cérvix no início da década de 80, para o HPV-16 e HPV-18 (zur HAUSEN, 2002) (Tabela 1).

Tabela 1: Cronologia dos principais eventos envolvidos no estudo do HPV e Câncer Cervical

Ano	Descobertas, eventos ou fatos principais
1974-76	Início do postulado entre a infecção do HPV e o câncer cervical.
1977	Isolamento do HPV em verrugas genitais e papiloma laringeal
1981	zur Hausen detecta DNA de HPV em neoplasias cervicais
1983	Isolamento e clonagem de HPV-16 de biopsia de <i>cervix</i>
1984	Isolamento e clonagem de HPV-18 de biopsia de <i>cervix</i>
1985	Estrutura e transcrição do HPV em células com carcinomas
1987	Primeiros grandes estudos epidemiológicos → Relação entre a infecção e a idade
1989	Proposição do modelo das oncoproteínas E6/E7 na transformação celular
1991	IARC [†] e WHO [‡] declaram oficialmente a associação entre o HPV e câncer cervical

[†] Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês “International Agency for Research on Cancer”);

[‡] Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês “World Health Organization”).

Até o presente momento, mais de 100 tipos ou subtipos de HPV têm sido isolados dos epitélios anal e genital. Os tipos mais frequentes de HPV oncogênicos, em pacientes com câncer cervical, são: 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58 e 35 (DERCHAIN et al. 2005).

As discussões e pesquisas nos anos subsequentes até a atualidade resultaram no maior esclarecimento sobre as atividades dos oncogenes virais, bem como no conhecimento da história natural da infecção do HPV, permitindo a proposição de modelos da resposta imunológica ao HPV (zur HAUSEN, 2002; STANLEY, 2005). A tabela 1 mostra a cronologia dos principais fatos e eventos desde o isolamento do HPV até a comprovação do mesmo como causa de câncer cervical.

O papilomavírus humano (HPV do inglês “Human Papillomavirus”) é o agente etiológico mais importante envolvido no desenvolvimento do câncer cervical (BRENNAN *et al.*, 2003). Embora já se conheça a associação do HPV com as lesões precursoras do câncer cervical, a infecção pelo HPV foi inicialmente reconhecida como a causadora de verrugas cutâneas (BURD, 2003). Atualmente o HPV está associado a uma variedade de condições clínicas que acometem tanto a mulher quanto o homem, promovendo desde lesões que regridem espontaneamente ao câncer (BURD, 2003) (Tabela 2).

Tabela 2: Doenças e lesões ocasionadas pelo HPV e o tipo de HPV mais comum em cada caso.

Doenças	Tipo de HPV
Verruga Plantar	1, 2, 4, 63
Verruga Comum	2, 1, 7, 4, 26, 27, 29, 41, 57, 65, 77, 1, 3, 4, 10, 28
Verruga Flat	3, 10, 26, 27, 28, 38, 41, 49, 75, 76
Outras lesões cutâneas [†]	6, 11, 16, 30, 33, 36, 37, 38, 41, 48, 60, 72, 73
Epidermodisplasia verruciformis	2, 3, 10, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 50
Papilomatoses respiratórias recorrentes	6, 11
Hiperplasia epitelial focal de Heck	13, 32
Conjunctival papilomas/carcinomas	6, 11, 16
Condiloma acuminata (verruca genital)	6, 11, 30, 42, 43, 45, 51, 54, 55, 70
Neoplasia intraepitelial cervical	
Inespecífica	30, 34, 39, 40, 53, 57, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69
Baixo risco	6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 74
Alto risco	16, 18, 6, 11, 31, 34, 33, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 66
Carcinoma cervical	16, 18, 31, 45, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 66, 68, 70

[‡] Traduzido de Burd, 2003;

[†]por exemplo: cistos epidermóides, carcinoma laríngeo.

2.1.2 HPV NO BRASIL E NO MUNDO

Infecções persistentes do HPV causam praticamente todos os mais de 500.000 casos de câncer cervical invasivo por ano no mundo (BOSCH et al, 2002). Em 2008 foram relatadas 250.000 mortes por câncer cervical, tornando-se esta a terceira principal causa de morte por câncer em mulheres (FERLAY et al, 2010).

Em 2009, a taxa anual de casos de câncer invasivo do colo do útero nos Estados Unidos caiu para cerca de 11.000 casos por ano, com 4.000 mortes (JEMAL et al, 2009). No entanto, bilhões de dólares são gastos por ano em 75 milhões de consultas de triagem e consequente visitas de diagnóstico e tratamento para lidar com seus precursores, e as várias pequenas anormalidades citológicas que são extremamente improváveis de se tornarem cancerosas (SOLOMON et al, 2007; SARAIYA, 2010).

No Brasil, estimam-se 20 mil casos novos de câncer de colo de útero ao ano, uma incidência estimada em 20/100 mil (a). Atualmente, o câncer do colo uterino é considerado o terceiro mais comum na população feminina, sendo superado pelo câncer de pele não-melanoma e pelo câncer de mama. Representa a terceira causa de óbito por câncer entre mulheres, com uma taxa de mortalidade de aproximadamente 4,61 por 100 mil mulheres, no ano de 2002, sendo o pico de incidência por idade entre 40 e 60 anos. As estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA) apontaram 18.430 novos casos de câncer do colo do útero no Brasil para o ano de 2010, sendo 1.820 novos casos somente na Região Norte (INCA, 2011).

2.1.3 ESTRUTURA E INFECÇÃO POR HPV

Os HPVs, pertencentes à família Papillomaviridae, são pequenos vírus não-envelopados de 55 nm de diâmetro que apresentam grande resistência ao calor e a dessecação (BURD, 2003; ZHENG et al., 2006). O vírion maduro é formado por um capsídeo icosaédrico protéico (Figura 1) constituído por no mínimo duas proteínas estruturais virais, L1 e L2. A proteína L1 perfaz 80% de toda a produção protéica viral e ao organizar-se em pentâmeros forma a unidade central do capsídeo, os capsômeros. Ao todo, 72 capsômeros formam o capsídeo viral, dando ao vírus a aparência de uma “bola de golfe” (zur HAUSEN, 2002; BRENNAN et al, 2003; BURD, 2003). Por definição um novo tipo de HPV é identificado quando apresenta mais de 10% de variação na sequência de DNA da região codificante da proteína estrutural L1 (GOSTOUT et al., 1999). O capsídeo

icosaédrico protéico protege o genoma circular de DNA dupla fita do HPV que possui aproximadamente 7,9 kb (BRENNAN et al, 2003; BURD, 2003; ZHENG et al., 2006)

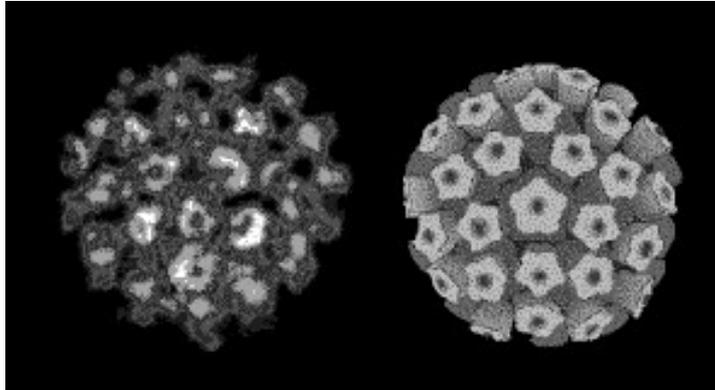


Figura 1 – Imagem computadorizada de um modelo do capsídeo icosaédrico de HPV.

Fonte: <http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/emimages.html>

Ao longo do genoma viral existem 8 ORFs (do inglês “Open Reading Frames” traduzido como Fase de Leitura Aberta), ou seja, 8 sequências de DNA que codificam proteínas, e uma longa região controladora (LCR3) da expressão dos genes virais e da duplicação genômica. Basicamente, o genoma pode ser funcionalmente dividido em três regiões distintas: (1) genes tardios (do inglês “Late gene”, L1-L2) que são expressos secundariamente após a infecção, cujas proteínas são responsáveis pela formação do capsídeo; (2) Genes precoces (do inglês “Early gene”, E1-E7) que são caracterizados pela expressão inicial durante o ciclo de vida do vírus e controlam a transcrição e replicação viral, atuando na transformação celular (Tabela 3), (3) e por uma LCR, que apresenta vários sítios de ligação a repressores e ativadores da transcrição estando também envolvida nos processos de replicação (Figura 2) (RODEN et al., 2004; MONTROYAMA et al., 2004).

Tabela 3: Principais atividades e funções das proteínas do HPV.

Proteína	Função/Atividade
E1	Atua na replicação do DNA extracromossomal; atividade DNA helicase; atividade ATPase.
E2	Regulação da replicação do DNA extracromossomal e da transcrição; controle da transcrição dos “early genes”.
E4	Ainda não totalmente elucidada. Parece atuar no processo de maturação viral
E5	Papel transformante.
E6	Papel transformante e imortalizante; inativação da p53.
E7	Papel transformante e imortalizante; indução da síntese de DNA; inativação da pRB.
L1	Capsídeo protéico maior
L2	Capsídeo protéico menor

†adaptado de Greenblatt, 2005; Kim *et al.*, 2006.

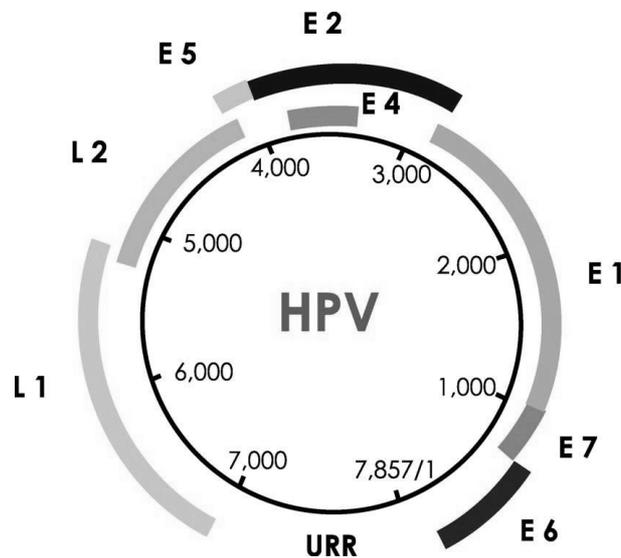


Figura 2. Apresentação esquemática do genoma do HPV mostrando a disposição dos genes precoces (E ou não-estruturais), os genes do capsídeo (L1 e L2) e a região reguladora upstream (URR).

Fonte: MUÑOZ *et al.*, 2006

Apesar da infecção pelo HPV de alto risco ser um evento inicial na formação do carcinoma cervical, este fator não representa inevitavelmente o desenvolvimento de um câncer com semelhante infecção (LAU et al., 2005). Estudos mostram que existem outros fatores de riscos envolvidos e podem ser divididos em: (1) fatores de risco à infecção pelo HPV e (2) fatores de risco à progressão ao câncer (Tabela 4) (FERENCZY et al., 2002; zur HAUSEN, 2002; BURD, 2003). Dentre os fatores de risco à progressão ao câncer, também chamados de co-fatores, estão os fatores hormonais, o hábito de fumar (tabaco), elevado número de partos, métodos contraceptivos orais a base de esteróides (como a progesterona), infecção por *Chlamydia thrachomatis*, imunossupressão, carga viral e variantes dos genótipos dos HPVs. Existem ainda outros co-fatores descritos relacionados ao desenvolvimento do câncer, tais como o número de parceiros sexuais e classe social da mulher (FERENCZY et al., 2002; BURD, 2003; MONTOYAMA, et al., 2004).

Tabela 4: Fatores de risco envolvidos na progressão ao câncer cervical e à infecção pelo HPV.

Fatores de Risco	
Progressão ao câncer cervical	Infecção ao HPV [†]
Fatores Hormonais	Idade
Fumar	Múltiplos parceiros
Alta parição	Início da atividade sexual precoce
Métodos contraceptivos orais	Imunossupressão
Co-infecções (<i>Chlamydia thrachomatis</i>)	Co-infecções (esquistossomose)
Imunossupressão	Infecções múltiplas de HPVs
Carga viral e variantes do HPV	Variantes do HPV
Vários parceiros	Frequência de re-infecção
Classe social	

[†]Papilomavírus Humano.

No Brasil, o HPV-16 é o mais frequente em neoplasias de colo de útero, seguida pelos tipos 33, 18 e 31. No Nordeste e Centro-Oeste, o HPV-33 e 31 são os tipos que apresentam maior incidência depois do HPV-16, enquanto que nas regiões Norte, Sudeste e Sul, o HPV-18 é o segundo mais frequente entre os casos de câncer de colo de útero (CAVALCANTI et al., 1994; INCA, 2011; GONÇALVES et al., 1999; NORONHA et al., 1999; LORENZATO et al., 2000; RABELO-SANTOS et al., 2003).

A passagem do vírus para um estado integrado, tornando a infecção persistente, está associada à progressão do câncer e tem sido extensivamente estudada a fim de esclarecer o papel chave da integração na cascata patogênica do HPV relacionada com o câncer cervical (TYRING, 2000; FERENCZY et al., 2002; GREENBLATT et al., 2005).

2.1.4 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

Um dos métodos primordiais utilizados na citologia convencional para o diagnóstico do HPV foi introduzido pelo patologista George Papanicolaou em 1949 denominado de “Papanicolaou-stained (Pap) smear”. O “Pap smear” baseia-se em mudanças nas células da zona de transformação do cérvix ocasionadas pelo HPV (BURD, 2003). Apesar de ter ajudado a diminuir a taxa incidência e a mortalidade por câncer cervical, o “Pap smear” apresenta diversas limitações práticas, apresentando uma alta taxa de resultados falso-negativos. Dessa forma, diversas adaptações são realizadas para minimizar esta taxa de resultados negativos falsos. Uma delas é a chamada de citologia de monocamada, onde os espécimes coletados são armazenados numa solução de preservação, evitando que as células sejam espalhadas diretamente na lâmina do microscópio (BURD, 2003).

Vários trabalhos da literatura relatam que o diagnóstico do HPV é dado pelo exame clínico, como colposcopia, e biópsia que informam sobre as características da lesão, enquanto que os exames de biologia molecular permitem identificar os tipos de HPVs, sendo estes considerados exames de maior sensibilidade e os mais usados na atualidade nos principais centros de pesquisa (OLIVEIRA et al., 2003; BURD, 2003; CASTRO et al., 2004). Os exames moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e captura híbrida, permitem a confirmação mais sensível da presença do HPV na lesão, enquanto que outros, como PCR-RFLP (“restriction fragment length polymorphism”), PCR alelo específica, PCR em tempo real e sequenciamento permitem a tipagem do HPV, definindo-

os como de alto ou baixo risco ou ainda definindo o tipo do HPV (LORENZATO et al, 2000; DRAGANOV et al, 2005). Ambos os tipos de exames, citológico e molecular, auxiliam na escolha do tratamento, aumentando assim sua eficácia.

2.2. NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL (NIC)

As neoplasias invasivas do colo uterino são em geral precedidas por uma longa fase de doença pré-invasiva. Pela análise microscópica, vários eventos celulares caracterizam a progressão das neoplasias cervicais. Estes vão desde a atipia celular e a graus variados de displasia antes de chegar ao carcinoma invasivo. Um bom conhecimento da fisiopatologia e alterações morfocelulares das NICs pode auxiliar nos diagnósticos colposcópicos, citológicos e anatomopatológicos, além de facilitar a compreensão dos princípios do tratamento dessas lesões (SELLORS & SANKARANARAYANAN, 2004).

Um sistema de nomenclatura em classes foi criado a partir de vários estudos de acompanhamentos citológicos, colposcópicos e histológicos, de pacientes com lesões cervicais. Entretanto, este se tornou cada vez mais arbitrário, pois certos casos de displasia regrediam, alguns persistiam e outros progrediam. Contudo, novos estudos permitiram uma maior compreensão sobre o processo de evolução das lesões, pois conseguiram estabelecer uma correlação direta entre o grau de comprometimento da espessura do epitélio cervical com a progressão das lesões. Com base nos dados supracitados, Richart em 1986, sugeriu que o termo neoplasia intraepitelial cervical (NIC) fosse utilizada para indicar uma variedade de atipia celular limitada à espessura do epitélio. Com isso, a NIC foi dividida em graus I, II e III. A NIC I correspondia ao mesmo grau de comprometimento da displasia leve, a NIC II ao da displasia moderada e a NIC III à displasia grave e carcinoma *in situ* (Figura 3) (MAGGI et al., 1989).

No ano de 1988, o National Cancer Institute dos Estados Unidos realizou um simpósio para tentar padronizar a nomenclatura para os diagnósticos de citopatologia cervical (APGAR, 2003; SOLOMON, 1989; KURMAN et al., 1991). Após três anos, um novo encontro foi realizado, e as sugestões e as observações destes dois simpósios ficaram conhecidas como Terminologia do Sistema de Bethesda (TSB) (APGAR, 2003).

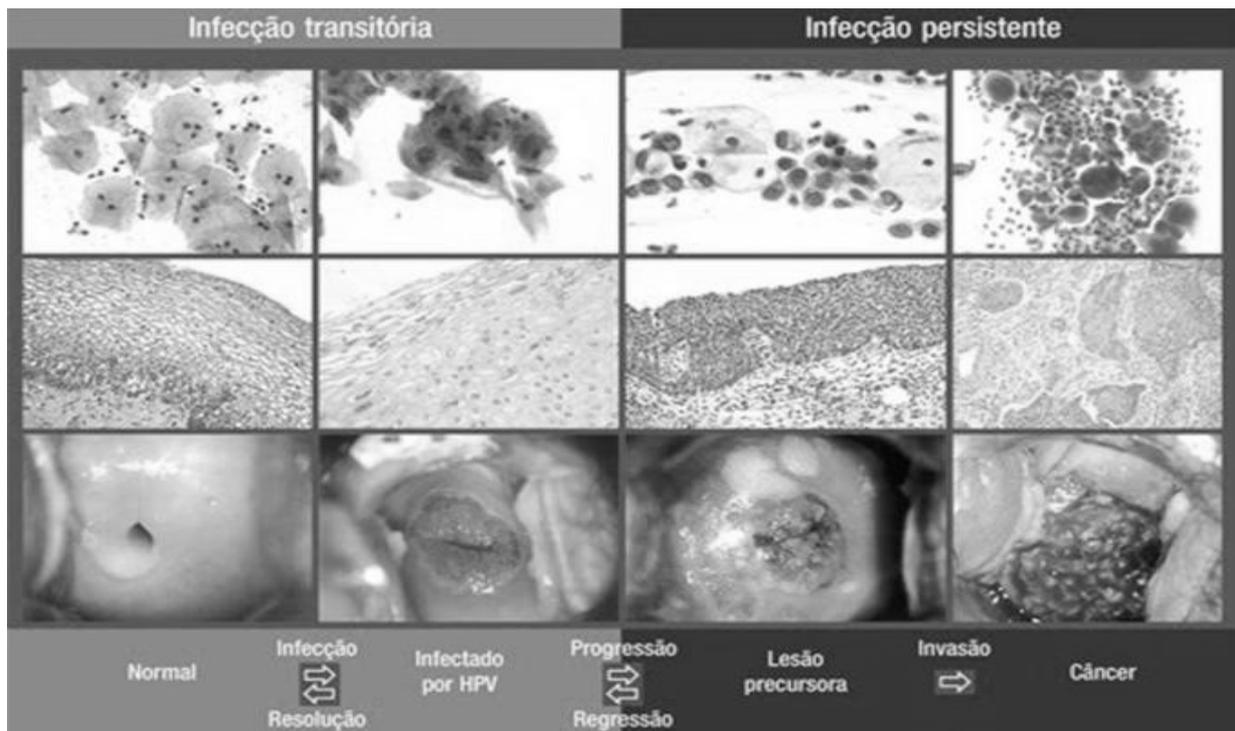


Figura 3 – Exames citológicos, histológicos e fotografias mostrando o avanço das lesões provocadas pelo HPV, resultando em câncer cervical.

Fonte: LOWY & HOWLEY, 2001.

A criação da Terminologia do Sistema de Bethesda foi baseada em dados citológicos, mas pode também ser utilizada para caracterização de cortes histológicos, pois passou-se a incluir também informações sobre o tipo de epitélio além do grau da lesão. Dessa forma, foi instituído o termo lesão intraepitelial escamosa (SIL), sendo esta nomenclatura dividida em duas classes de acordo com o grau da lesão: lesões de baixo grau (LSIL, do inglês “Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion”) e alto grau (HSIL, do inglês “High-grade Squamous Intraepithelial Lesion”) (SOLOMON et al., 2002). A classificação de LSIL inclui alterações mais leves (displasia leve/NIC I e alterações celulares associadas ao HPV), enquanto que HSIL compreende lesões mais avançadas (displasia moderada/NIC II, displasia severa, carcinoma in situ/NIC III) (APGAR, 2003; SOLOMON et al., 2002).

2.3. MECANISMOS DA RESPOSTA IMUNE AO HPV

O Sistema Imunológico é responsável pelo reconhecimento de substâncias estranhas ao organismo e sua eliminação, pela remoção de células mortas e/ou danificadas e pela destruição de células mutantes e cancerosas (LEHNER, 2003; SIERRA et al., 2005; MAGNADOTTIR, 2006).

O sistema imune humano apresenta dois componentes principais envolvidos no mecanismo de eliminação das partículas estranhas (ou antígenos), chamados de imunidade inata e imunidade adquirida. Eles são responsáveis por respostas diferentes, e juntos completam um complexo sistema de interações e respostas com maior eficiência na eliminação dos antígenos.

A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa do organismo, na interface entre o meio externo e o organismo (em tecidos mais expostos como a pele e as mucosas), sendo capaz de induzir tanto uma resposta rápida e inespecífica à infecção como a ativação da imunidade adaptativa. A atividade ampla e inespecífica contra infecções por vírus, fungos e bactérias é capaz de produzir as primeiras respostas à infecção como a inflamação, quimiotaxia e a apresentação de antígenos ao sistema imune específico. O mecanismo inato é reproduzido principalmente pela atuação de fagócitos (macrófagos, CD e monócitos) e células citotóxicas como as NK (*natural killers*) e linfócitos CD8+, através da modulação da resposta inata por moléculas extracelulares (proteínas antimicrobianas, proteínas do complemento, proteínas C reativas), receptores citoplasmáticos e de membrana, quimiocinas e citocinas. Os receptores das células do sistema imune inato foram desenvolvidos durante o processo evolucionário (LEHNER, 2003; SIERRA et al., 2005; MAGNADÓTTIR, 2006; MACHADO et al., 2004).

A imunidade adaptativa é representada por células de reconhecimento altamente especializadas, pela presença de receptores antígeno-específicos de membrana e pela capacidade de reconhecimento e ativação mediada por anticorpos. A adaptabilidade à enorme diversidade de antígenos se dá por produção diversa de receptores e anticorpos por diferentes estratégias (rearranjos gênicos, co-dominância, polialelia, dentre outras) seguidas de seleção clonal (MACHADO et al., 2004).

O padrão de produção *in vivo* de citocinas é fortemente correlacionado com a progressão e/ou resolução de doenças infecciosas severas, incluindo as DST's (Doenças

Sexualmente Transmissíveis). O perfil genético do hospedeiro é considerado um dos principais fatores que regulam a diferenciação e polarização para uma resposta imune Th1 e Th2, estando relacionado com a duração da infectividade da DST. A primeira linha de defesa do hospedeiro é através da superfície das mucosas via sistema imune inato (LEHNER, 2003).

O modelo básico da resposta imune celular contra o HPV envolve primariamente o processamento e a apresentação dos antígenos virais pelas células de Langerhans. Na superfície dessas APCs encontram-se um grupo particular de receptores, os receptores padrões de reconhecimento (PRR, do inglês “pattern recognition receptors”), que reconhecem os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMP, do inglês “pathogens-associated molecular pattern”) presentes na estrutura do HPV. Juntamente com esse reconhecimento, entre PRR e PAMP, a ligação de citocinas pró-inflamatórias às CLs parece ser de fundamental importância, pois ativa tanto o processamento do antígeno como também a sua migração para os linfonodos. Durante a migração, as CLs tornam-se maduras e altamente especializadas na apresentação de antígenos via MHC classe II e capazes de ativar as células T nos linfonodos fazendo com que eles, via eferente, migrem para o sítio de infecção, mais especificamente para os queratinócitos infectados como células T efectoras (STANLEY, 2005).

O mecanismo de evasão viral envolve vários fatores. Primeiro, o ciclo natural de infecção do HPV já é por si só um eficiente mecanismo de inibição da resposta imune, de forma que a replicação viral, bem como sua liberação, não promovem a lise celular ou provocam efeitos citopatológicos (Figura 4). Em outras palavras, os queratinócitos morrem devido às “causas naturais” e liberam pouco ou nenhum sinal de perigo, na forma de citocinas, para o sistema imune. Em adição, os queratinócitos são programados para morrer e descamar em regiões longes dos sítios de vigilância imunológicas (STANLEY, 2005). A infecção pelo HPV é exclusivamente intraepitelial. Teoricamente, o HPV só é reconhecido pelas APCs profissionais do epitélio escamoso, as Células de Langerhans (CLs), as quais são consideradas células dendríticas intraepiteliais (POPPE *et al*, 1996; DE VILLIERS *et al.*, 2004). Segundo Stanley (2008), o capsídeo viral é quem ativa as CDs, mas há indícios de que as CLs não são ativadas na presença do capsídeo do HPV.

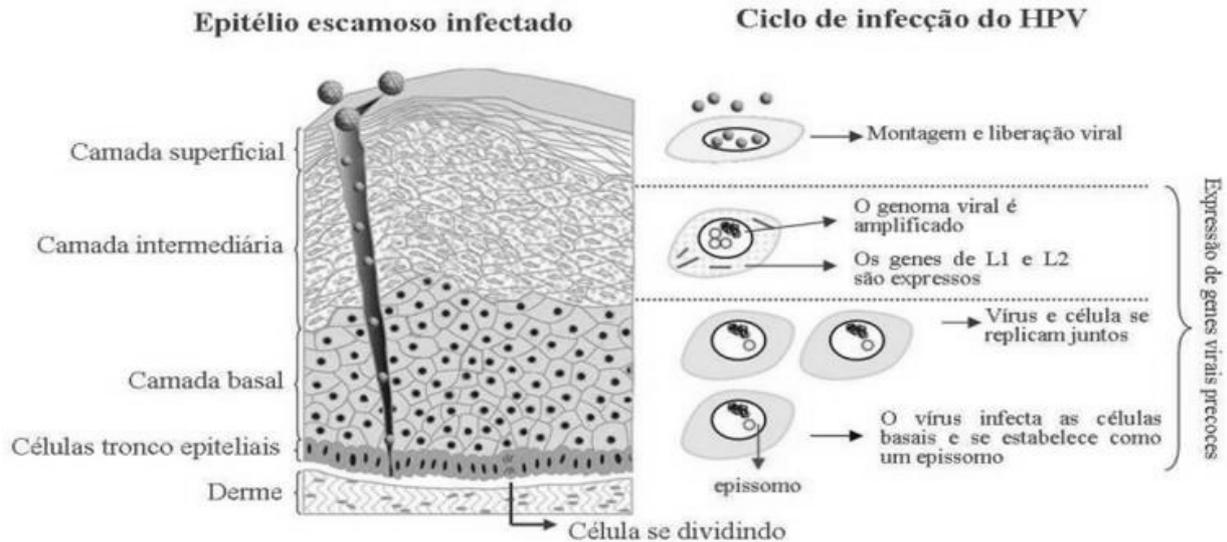


Figura 4 - Ciclo de infecção do HPV no epitélio estratificado.

Adaptado de DOORBAR, 2006.

2.4. POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA (SNPs)

Após a descrição de cerca de 3 bilhões de bases nucleotídicas que constituem a sequência genômica humana pelo Projeto Genoma Humano, foi possível estabelecer através de projetos como o HapMap (*International Haplotype Mapping Project*) o mapeamento e distribuição populacional de variações genéticas comuns (com frequências populacionais maiores que 1%), denominadas polimorfismos. O interesse pelas implicações de polimorfismos gênicos, principalmente dos polimorfismos de base única ou SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), estimados em mais de 10 milhões no genoma, tem contribuído para a descoberta de associações às respostas de determinados fármacos e à susceptibilidade e progressão das doenças, especialmente as infecções comuns (SYVANEN, 2005).

Polimorfismos gênicos funcionais como os codificantes (com troca de aminoácidos) e os não-codificantes (como na região promotora do gene, região não traduzida da extremidade 5'UTR, 3'UTR, regiões de *splicing* e íntrons) podem levar a alterações importantes na expressão gênica, tais como: alteração da propriedade constitucional ou enzimática, taxa de transcrição, estabilidade do RNA e processamento do RNA (Figura 5) (BROOKES, 1999).

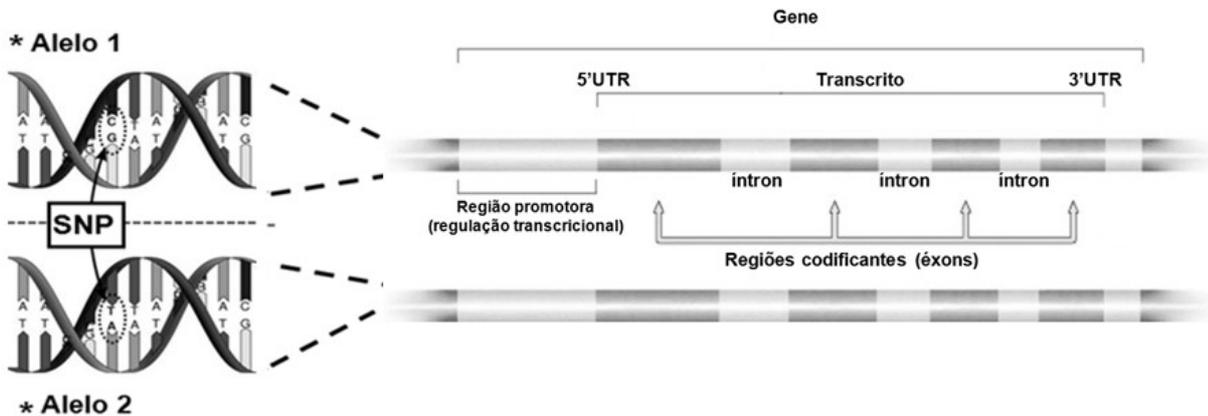


Figura 5 - Representação esquemática de um locus polimórfico de base única (SNP) e as regiões (*) nas quais os SNPs podem ter importância funcional.

Fonte: BROOKES, 1999.

O efeito de conservação de alelos genéticos de loci diferentes em conjunto durante a herança genética é conhecido como desequilíbrio de ligação (ou *linkage disequilibrium*, LD). Este efeito é capaz de gerar um número mais limitado de combinações alélicas de diferentes SNPs, conhecidos como haplótipos, do que se fossem herdados independentemente. Evidências sugerem que a variação inter-individual da expressão gênica pode ser determinada pelos diferentes haplótipos, ratificando a importância dos efeitos em conjunto dos SNPs, além da contribuição singular de cada polimorfismo (Figura 6) (RISCH, 2000).

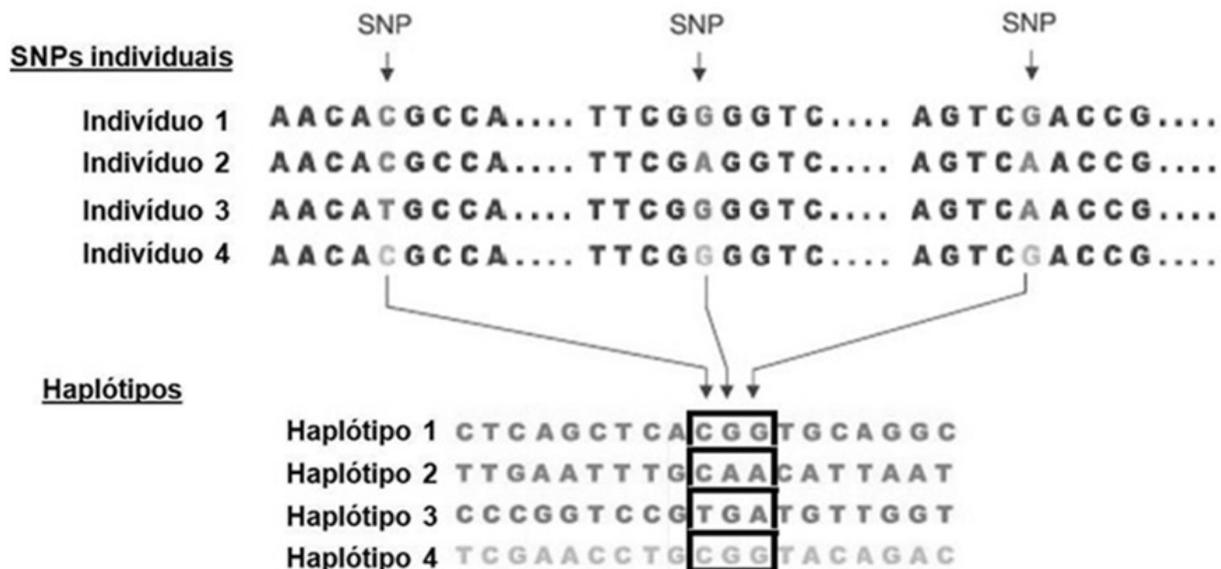


Figura 6 - Formação de haplótipos à partir dos SNPs em LD. As variações causadas pelos SNPs levam à produção de diferentes haplótipos e consequentes diferenças entre os indivíduos.

Adaptado de BROOKES, 1999.

Alguns SNPs ou alelos podem ser correlacionados a diversas variáveis, como predisposição à infecção, desenvolvimento patológico, níveis de carga viral, entre outros. Essas associações têm sido bastante estudadas em doenças auto-imunes e infecciosas, sendo responsáveis pelo reconhecimento imuno-específico durante a apresentação de antígenos, atuando na eficiência da resposta citotóxica (RAFATPANA, 2006)

2.5. **PROTEÍNA BETA-DEFENSINA HUMANA 1 (hBD-1)**

O ambiente habitado pelos seres humanos é inevitavelmente contaminado por um grande número de microrganismos, tornando-se essencial desenvolver mecanismos de defesa do hospedeiro contra os invasores. Os revestimentos epiteliais da pele, digestivo e genito-urinário e a árvore traqueobrônquica produzem um número enorme de peptídeos com atividade antimicrobiana (MENDEZ-SAMPERIO, 2008).

Algumas dessas moléculas antimicrobianas apresentam um caráter de sinalização para as células envolvidas na defesa inata e adquirida na resposta imune, incluindo catelicidina, psoriasina, dermicidina e defensinas (PAZGIER et al. 2006). Em humanos, foram detectadas duas famílias de defensinas: Alfa e Beta. Estes pequenos peptídeos antimicrobianos (de 3 a 4 KDa) têm em comum estruturas ricas em cisteínas, onde as folhas β estruturais são estabilizadas por três pontes dissulfeto intramoleculares entre os resíduos de cisteína (BULLARD et al., 2008). A classificação nas categorias Alfa, Beta e Teta (presente em outros organismos) defensinas se dá pela diferença encontrada na distribuição das pontes dissulfeto entre seus membros. Estes peptídeos formam uma família protéica com seus respectivos genes codificadores (todas as Alfa e Teta, e a maioria das Beta defensinas) localizados em uma região de cluster gênico nos loci cromossômicos 8p23.2 e 8p23.1 (HOLLOX et al., 2003; KLOTMAN & CHANG, 2006).

Entre as Beta defensinas humanas, está a hBD-1, codificada pelo gene *DEFB1*. Estudos de regulação da expressão da hBD-1 não apenas contribuíram para uma maior compreensão sobre os mecanismos de defesa da mucosa humana, mas também apresentam um potencial de aplicação na prevenção e no tratamento de infecções respiratórias, genito-urinárias e do trato digestório (HORNE et al. 2008; SCHENK, 2008; MUELLER, 2008).

Esta defensina é expressa constitutivamente pelas células epiteliais e pelos queratinócitos, podendo ser induzida pela presença de microrganismos e fatores inflamatórios, pois a região 5' UTR contém sítios de ligação consenso para Interleucina-6, fatores nucleares e Interferon- γ (RAJ et al., 2002). O primeiro produto pós-tradução é um pré-propeptídeo, de maneira que o éxon 1 codifica uma região sinal N-terminal e uma porção do segmento pro-, e o éxon 2 codifica a porção final do segmento pro- e o peptídeo catiônico que apresenta atividade antimicrobiana após clivado (Figura 7) (BALS, 2000).

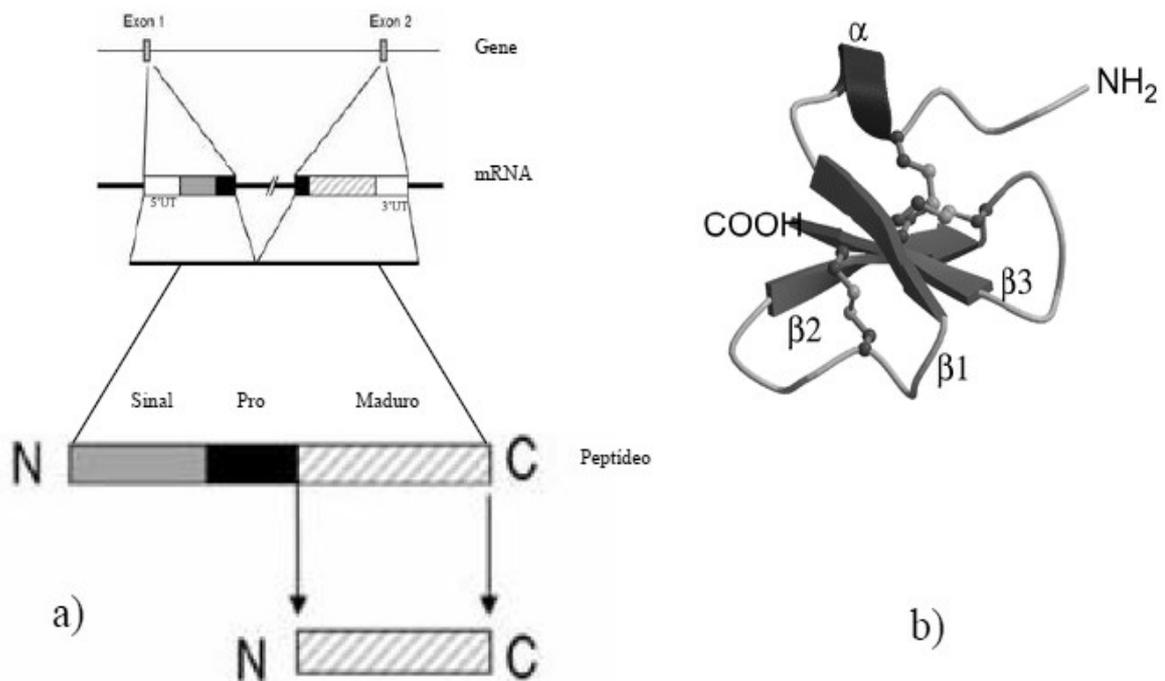


Figura 7: Beta-defensina humana 1. a) Organização gênica; b) Estrutura proteica.
Adaptado de BALS, 2000.

A atividade direta das defensinas ocorre por indução da ruptura de membranas por formação de poro e de interações eletrostáticas não-específicas em membranas, descrita contra diversos vírus, fungos e bactérias (HOOVER *et al.*, 2001).

A função imunorregulatória do gene *DEFB1* foi proposta por experimentos *in vitro*, no qual a Beta defensina humana 1 (hBD-1) demonstrou atividade quimiotática de células dendríticas imaturas (iCD) e células T de memória através do receptor CCR6 (YANG *et al.*, 1999). Esta quimiotaxia facilitaria a captura, processamento e apresentação de

antígenos virais pelas CD promovendo assim a ligação entre imunidade inata e adaptativa (Figura 8).

A característica única do gene *DEFB1* é que o segmento pró-peptídeo é no exon 1 e não no exon 2 como em todas as outras Beta-defensinas (PAZGIER et al., 2006). O *DEFB1* é geralmente considerado como um gene de cópia única, embora alguns indivíduos apresentem duplicons (CAGLIANI et al., 2008).

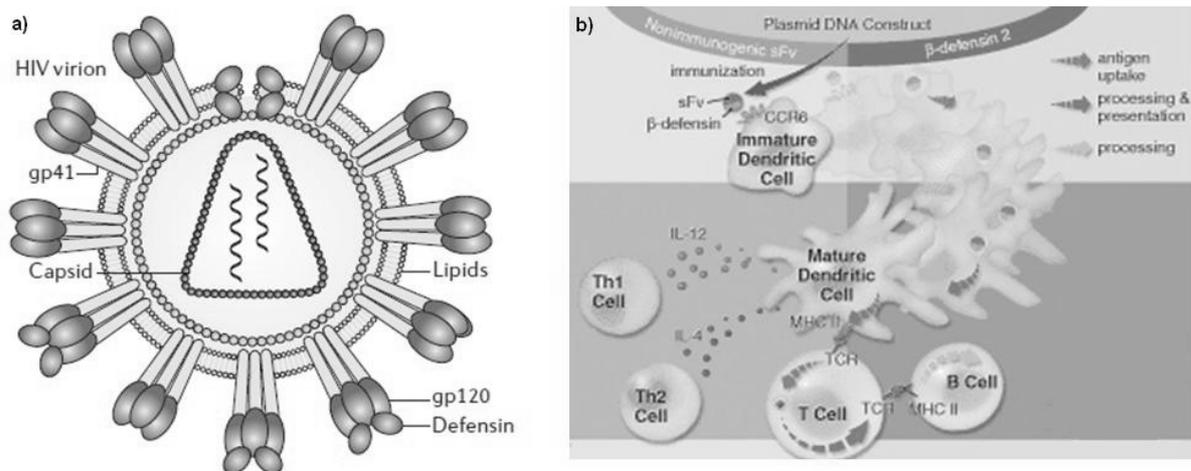


Figura 8 - Função antimicrobiana direta e imunorregulatória (esta prevista em ensaios *ex vivo*) das defensinas. a) Na ausência de soro, tal como na superfície das mucosas, as defensinas são capazes de inativar partículas de vírus envelopados rompendo os envelopes virais através da interação com glicoproteínas virais, tais como a gp120 presente no HIV. b) O construto contendo a Beta-Defensina 2 atua nas CDs imaturas, que expressam CCR6, tornando um antígeno não-imunogênico em imunogênico, demonstrando a imunidade antitumoral preventiva e terapêutica.

Fontes: KLOTMAN & CHANG (2006); Defensins and Antitumor Immunity (2002) - http://www.rndsystems.com/cb_detail_objectname_SU02_Defensins.aspx

As pesquisas têm se focado principalmente nas propriedades antimicrobianas da hBD-1, embora outras funções tenham sido descritas, como no desenvolvimento e lise celular e vias de supressão de tumores e alergias (PAZGIER et al., 2006; PRADO-MONTES DE OCA, 2010). Sua distribuição tem sido amplamente relatada em regiões de fundamental importância imunológica como: mucosas oral, nasal, pulmonar, urogenital, estomacal, intestinal e renal, plasma sanguíneo e nas glândulas salivares. A expressão constitutiva de hBD-1 tem sido relatada nos queratinócitos da pele, possuindo função de regulação por estímulo inflamatório e microbiano (KLOTMAN & CHANG, 2006). Recentes

trabalhos têm demonstrado os usos potenciais do gene *DEFB1* como indutores de resposta imunológica e inibidores do peptídeo no tratamento de doenças humanas relacionadas ao gene *DEFB1*, incluindo alergias, infecções e câncer (PRADO-MONTES DE OCA, 2010).

Análises imunohistoquímicas mostraram que tanto hBD-1 quanto hBD- 2 foram localizadas nas camadas superiores dos tecidos epiteliais do papiloma (CHONG et al, 2006). Tanto a hBD-1, constitutivamente expressa, quanto as hBD-2 e hBD-3, de ação induzida, demonstraram ser microbicidas para uma variedade de patógenos, incluindo bactérias e fungos (CHONG et al, 2006). Alguns estudos mostraram que as hBD-1, 2 e 3 podem inativar vírus envelopados e não envelopados (como é o caso do HPV), incluindo vírus da imunodeficiência humana vírus tipo 1 (HIV-1) e adenovírus (QUIÑONES-MATEU et al., 2003; RAJ & DENTINO, 2002).

O gene *DEFB1* é altamente polimórfico. Três SNPs localizados nas posições -52 (G/A), -44 (C/G) e -20 (G/A) na região 5' UTR apresentam importante papel na modulação na expressão da hBD-1 e estão associados com diversas infecções (BRAIDA et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2009). A hipótese consiste na barreira protetora da pele e da mucosa realizada pela expressão constitutiva da hBD-1, de forma que a hBD-1 interaja com as partículas virais ou com as células de resposta imune (BRAIDA et al., 2004). A hBD-1 age em sinergia com outros peptídeos antimicrobianos expressos na pele e na superfície da mucosa (como hBD-2, 3 e LL-37) (HOLLOX, 2003).

O alelo G do SNP -44 está associado com maiores níveis constitutivos de ambos hBD-1 e hBD-3 em queratinócitos, de modo que condiz com a proteção de candidíase oral. Em contraste, o alelo C está associado a uma maior expressão de hBD-1 e hBD-3 em queratinócitos estimulados pelo Interferon- γ (IFN- γ) e é provável que esteja relacionado com proteção em condições com níveis elevados de IFN- γ , tais como a periodontite crônica. O contraste de níveis constitutivos x induzidos de hBD-1 e hBD-3 torna a interpretação dos estudos genéticos para o locus do SNP -44 do gene *DEFB1* bastante complexo (KALUS et al, 2009).

Uma possível explicação para estas diferenças de expressão é mostrada na estrutura do mRNA do gene *DEFB1*. Os haplótipos dos SNPs localizados na região 5' UTR são capazes de alterar a estrutura secundária do mRNA, o que provocaria uma

regulação pós-transcricional para este gene (Figura 9). O SNP -44 aparenta ser o maior responsável pelas complexas alterações na expressão e indução de múltiplas Beta-defensinas (KALUS et al, 2009).

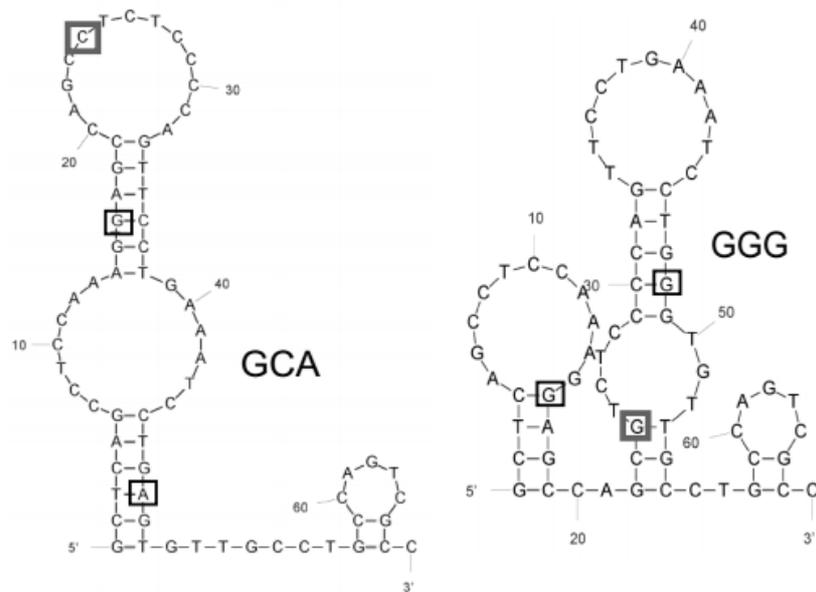


Figura 9 - Estrutura secundária da região 5' UTR do mRNA do gene *DEFB1*. As localizações dos SNPs estão indicadas e o SNP -44 está em vermelho. Nota-se que o local do SNP -44 no haplótipo GGG se encontra em uma estrutura de haste hibridizada. Em contraste, como representado pela estrutura do haplótipo GCA, a o SNP -44 se encontra em um loop ou configuração não-hibridizada nos outros três haplótipos. Estruturas similares foram obtidas em três ensaios separados. Estruturas secundárias com a menor ΔG (G = energia livre de Gibbs) foram avaliados.

Fonte: KALUS et al, 2009

2.6. SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento do DNA é uma técnica para análise detalhada de um gene. O método de sequenciamento de DNA mais utilizado é o automático, baseado no método de Sanger-Coulson, desenvolvido em 1979, também conhecido como método de terminação de cadeia, que permite determinar a ordem exata dos nucleotídeos em um segmento de DNA. No sequenciamento automático, o sequenciador identifica os fragmentos por meio

da incidência de laser sobre os dideoxinucleotídeos fluorescentes. Nesta técnica, os nucleotídeos são marcados com quatro fluorocromos diferentes, um para cada nucleotídeo (A, C, G, T). O método baseia-se na síntese de uma segunda fita de DNA complementar ao DNA molde, na presença de um *primer* complementar à sequência. O fragmento de Klenow da DNA polimerase I inicia o alongamento da cadeia complementar a partir da extremidade 3' do *primer*; os deoxinucleotídeos - dNTP - (dATP - deoxiadenosina trifosfato -, dTTP - deoxitimidina trifosfato -, dGTP - deoxiguanosina trifosfato -, dCTP - deoxicitosina trifosfato) são selecionados de acordo com o pareamento ao molde e ligados a cadeia por ligações fosfodiéster (AUSUBEL et al., 2003; NASCIMENTO et al., 1999).

Como, para cada dNTP, utiliza-se um fluorocromo diferente, a eletroforese é realizada em um único canal do gel de sequenciamento. À medida que os fragmentos passam pelo feixe de laser, os fluorocromos são excitados e a luz emitida, em diferentes comprimentos de onda, é detectada por um fotomultiplicador. Esta informação é traduzida na forma de sequência por meio de um computador e apresentada no eletroferograma (Figura 10) (AUSUBEL et al., 2003; NASCIMENTO et al., 1999).

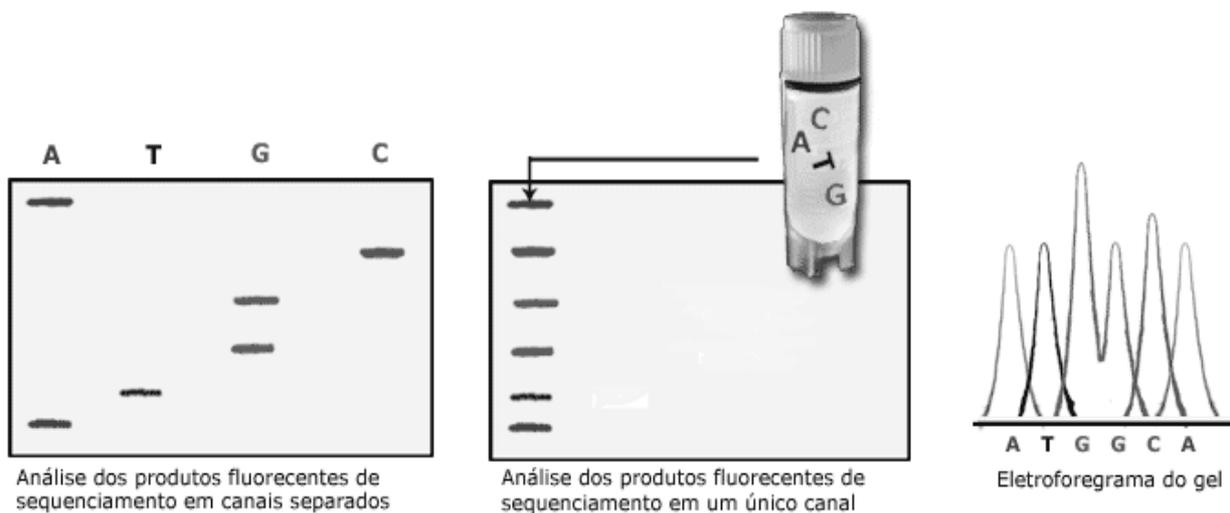


Figura 10: Etapas do sequenciamento e Eletroferograma mostrando os picos correspondentes às bases. Adaptado do website: educacao.genesis.dbm.com.br/sequenciamento.shtml

3. OBJETIVOS

3.1 - Geral:

Avaliar a associação dos polimorfismos do gene codificador da Beta Defensina Humana 1 (*DEFB1*) com a susceptibilidade à infecção e à progressão da lesão provocada pelo papilomavírus humano (HPV) de alto risco.

3.2 - Específicos:

1. Detectar a presença de HPV nas amostras de secreção vaginal, de modo a obter um grupo de pacientes HPV positivos e um grupo de indivíduos saudáveis.
2. Subtipar as amostras de HPV com *primers* específicos para HPV 16, 18, 31 e 33;
3. Detectar polimorfismos de base única (SNPs) funcionais presentes na região 5' UTR do gene *DEFB1* em pacientes portadores de HPV e no grupo de controles saudáveis através de sequenciamento direto.
4. Correlacionar os polimorfismos estudados neste gene com a susceptibilidade à infecção pelo HPV de alto risco na população de estudo.
5. Correlacionar os polimorfismos estudados neste gene com a progressão da lesão provocada pelo HPV de alto risco na população de estudo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - População de Estudo

A população de estudo foi composta por 160 mulheres HPV+ (grupo infectado) e 71 mulheres HPV- (grupo controle), que não tinham sido submetidas a tratamento prévio do colo uterino, atendidas no Centro de Diagnóstico do Câncer em João Pessoa - PB.

4.2 - Critérios de inclusão

O grupo de estudo foi composto por amostras de secreção vaginal de mulheres com citologia oncótica realizada nas redes credenciadas municipais e/ou estaduais, apresentando ou não lesões intraepiteliais cervicais de baixo e alto grau.

4.3 - Critérios de exclusão

Foram excluídas do estudo amostras de secreção vaginal de mulheres HIV-positivas e pacientes que tivessem sido submetidas a radioterapia ou quimioterapia para neoplasia invasiva cervical.

4.4 - Extração de DNA das amostras clínicas

As amostras clínicas foram obtidas através da realização da raspagem com "CYTOBRUSH" da região da lesão. As secreções foram coletadas em tubos contendo meio adequado para preservação de células. Para a extração do DNA genômico foi utilizado o kit NucleoSpin Tissue (MACHEREY-NAGEL) de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração as amostras foram mantidas a uma temperatura de -20 °C.

4.5 - Detecção do HPV por PCR

Para verificar a ausência de inibidores, a integridade e a qualidade do DNA extraído, foi realizado para cada amostra selecionada um controle da PCR utilizando os *primers* iniciadores PC04 e GH20 que flanqueiam uma sequência em torno de 268 pb do gene da Beta-globina.

A infecção por HPV foi diagnosticada através do uso de dois conjuntos de *primers* consenso. Foram realizadas duas reações, uma delas utilizando-se os *primers* MY09 e MY11 e outra com os *primers* GP05+ e GP06+.

Para detecção do HPV com MY09/11 foi realizada uma mistura de reação para PCR contendo: 1X *Master Mix Colorless* PROMEGA e 1pmol/μl de *primers* genéricos (MY09 e MY11), 3μL de água e 200ng do DNA molde. Após a amplificação é esperado um fragmento de 450pb.

Foram utilizados os *primers* consenso MY 09 5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3' e MY 11 5'-GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3'.

As condições de ciclagem para a PCR foram: 94 °C por 4 minutos, seguidos por 40 ciclos a 94 °C por 30 segundos, anelamento à 55° C por 30 segundos e extensão à 72 °C por 30 segundos, seguidos de uma extensão adicional à 72 °C por 8 minutos.

Das amostras negativas para a amplificação com os *primers* MY09 e MY11, foi realizada uma nova reação de amplificação com os *primers* internos GP05+ e GP06+. A reação foi realizada para um volume final de 15μl contendo 1x de tampão da PCR, 200μM de cada dNTP, 3,5mM de MgCl₂, 1pmol/μl de cada *primer* específico (GP05+ e GP06+), 1 U de Taq DNA polimerase e 200ng de DNA. Para essa reação também foi utilizado o kit "GoTaq® *Hot Start Polymerase*" (PROMEGA).

A sequência dos *primers* internos GP05+ e GP06+ são dadas a seguir: GP05+ (5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3') e GP06+ (5'-GAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3').

A ciclagem do protocolo de amplificação utilizado com o sistema GP05+/GP06+ foi o seguinte: 94 °C por 4 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação à 94 °C por 1 minuto, anelamento à 45 °C por 2 minutos e extensão à 72 °C por 1,5 minutos, seguidos de uma extensão adicional à 72 °C por 4 minutos. Após a amplificação é esperado um fragmento de 150pb.

4.6 - Tipagem do HPV

A tipagem do HPV foi realizada através de uma mistura de reação 1X *Master Mix Colorless* PROMEGA e 1pmol/μl de *primers* específicos para a identificação dos HPVs de

alto risco (16, 18, 31 ou 33), 3µL de água livre de nucleases e 200ng do DNA molde. O programa de ciclagem consistiu de um ciclo de 94 °C por 5 min, 35 ciclos de 95 °C por 30s, 57 °C por 30s e 72 °C por 60s uma extensão final de 72 °C por 10 min, de acordo com o protocolo de Karlsen et al. (1996). Após a amplificação é esperado um fragmento de 499pb para o HPV-16, 172pb para o HPV-18, 153pb para o HPV-31 e 211pb para o HPV-33.

A separação do produto da amplificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com *Blue Green Loading Dye* (LGC) e visualizado em luz ultravioleta. Os amplicons foram comparados com o marcador de peso molecular *ladder* 100pb (Promega).

4.7 - Genotipagem do gene *DEFB1*

Os polimorfismos da região 5' UTR do gene *DEFB1* foram analisados através de sequenciamento direto (baseado no método de Sanger) em parceria com a Universidade de Trieste, na Itália.

A PCR convencional foi realizada utilizando o termociclador Life Express (BIOER Technology) como plataforma. Cada PCR continha 0,5 ul de *primer* forward e de *primer* reverso, 2,5 ul de tampão, 2 ul de MgCl₂ e 2 ul de dNTPs. Foram utilizados 0,2 ul de taq polimerase e 16,3 ul de água para cada 1ul de DNA, resultando em um volume final de 25 ul.

As condições de termociclagem para a PCR foram: 95 °C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos a 95 °C por 30 segundos, anelamento à 55° C por 30 segundos e extensão à 72 °C por 30 segundos, seguidos de uma extensão adicional à 72 °C por 7 minutos. Após a amplificação é esperado um fragmento de 407pb.

Os produtos de PCR obtidos foram então sequenciados. As sequências de DNA foram obtidas utilizando o kit de sequenciamento Big Dye Terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante. As reações aconteceram utilizando o ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), e os dados do sequenciamento foram analisados com o software Aligner versão 3.7.1 (CodonCode Corporation).

4.8 - Escolha de *primers*

A escolha do comprimento do fragmento (407pb) e de *primers* com temperaturas de

4.9 - Análises estatísticas

As frequências alélicas e genóticas dos SNPs foram calculadas através do software Genotype Transposer para o grupo de mulheres HPV positivas e grupo controle. O mesmo software foi utilizado para verificar se ambos os grupos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O teste do Qui-quadrado e o teste exato de Fisher foram empregados para avaliar diferenças estatísticas na distribuições genóticas e alélicas de acordo com a infecção pelo HPV e com a progressão da lesão utilizando o software R. Valores com *p-value* menores que 0.05 foram considerados estatisticamente significativos. A formação dos haplótipos formados pelos três SNPs do gene *DEFB1* foi realizada através do software Arlequin (versão 3.5).

5. RESULTADOS

Das amostras de secreção vaginal analisadas, 160 foram positivas para o HPV de alto risco e 71 foram negativas para HPV. As amostras com HPV de baixo risco foram descartadas deste estudo e as amostras negativas para HPV compuseram o grupo controle saudável.

As amostras HPV positivas foram estratificadas de acordo com o grau de lesão, sendo assim divididas em dois grupos: 54 amostras LSIL (compreendendo lesões de baixo grau) e 106 amostras HSIL (compreendendo lesões de alto grau), baseado nas informações fornecidas pela equipe médica responsável.

A idade média da população infectada pelo HPV foi de aproximadamente 34 anos ($\pm 17,4$). A média de idade das pacientes HPV positivas LSIL foi de 33 anos ($\pm 14,0$); enquanto que no grupo HSIL a média de idade foi de 37 ($\pm 18,5$). A idade média do grupo controle saudável foi de aproximadamente 33 anos ($\pm 13,5$) (Tabela 6).

Tabela 6: Idade média em anos do grupo controle e do grupo de estudo estratificada por pacientes com grau de lesão LSIL e HSIL.

Idade Média (anos)	
	HPV +
	34 anos ($\pm 17,4$)
CONTROLES	LSIL
33 anos ($\pm 13,5$)	33 anos ($\pm 14,0$)
	HSIL
	37 anos ($\pm 18,5$)

Em seguida, foram realizadas as tipagens das amostras positivas em relação aos tipos virais de alto risco oncogênico: 16, 18, 31 e 33. Os produtos de amplificação resultaram em fragmentos de 499pb para o HPV-16, 172pb para o HPV-18, 153pb para o HPV-31 e 211pb para o HPV-33. Dentre as amostras positivas, 110 amostras (69%) foram tipadas como HPV-16, 21 (13%) como HPV-18, 21 (13%) como HPV-33 e 8 (5%) como HPV-31.

Todas as amostras, dos diferentes grupos analisados, foram submetidas a PCR gerando um produto de 407pb, para em seguida serem purificadas e submetidas a uma reação de sequenciamento para detecção dos três SNPs na região promotora do gene *DEFB1* (-52 G/A; -44 C/G; e -20 G/A). Os produtos da PCR foram separados através da técnica da eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com GelRed™ (Biotium) e visualizados sob a luz ultravioleta (Figura 12).

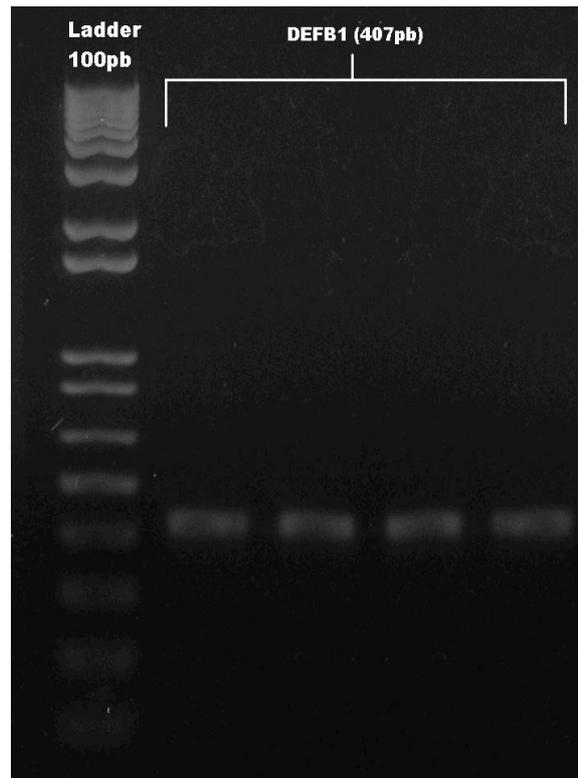


Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com GelRed™ (Biotium) com o produto de PCR do gene *DEFB1*, com 407pb, comparado ao marcador Ladder 100pb (Invitrogen).

Após o sequenciamento, todas as amostras foram alinhadas com a sequência original depositada no banco de dados genômico, sendo possível detectar os três genótipos possíveis para cada uma das três posições na região promotora do gene (-52 G/G, G/A e A/A; -44 C/C, C/G e G/G; -20 G/G, G/A e A/A). Para cada amostra, foram obtidas duas sequências, uma referente à reação Forward e outra à Reverse.

Ao comparar a sequência consenso do gene *DEFB1* com as sequências obtidas foi

possível genotipar as amostras dos grupos de estudo e montar as tabelas com as frequências genotípicas e alélicas. A sequência consenso do gene *DEFB1* é apresentada na Tabela 7.

Na figura 13 é mostrado um eletroferograma com o resultado do sequenciamento de uma das amostras positivas para HPV.

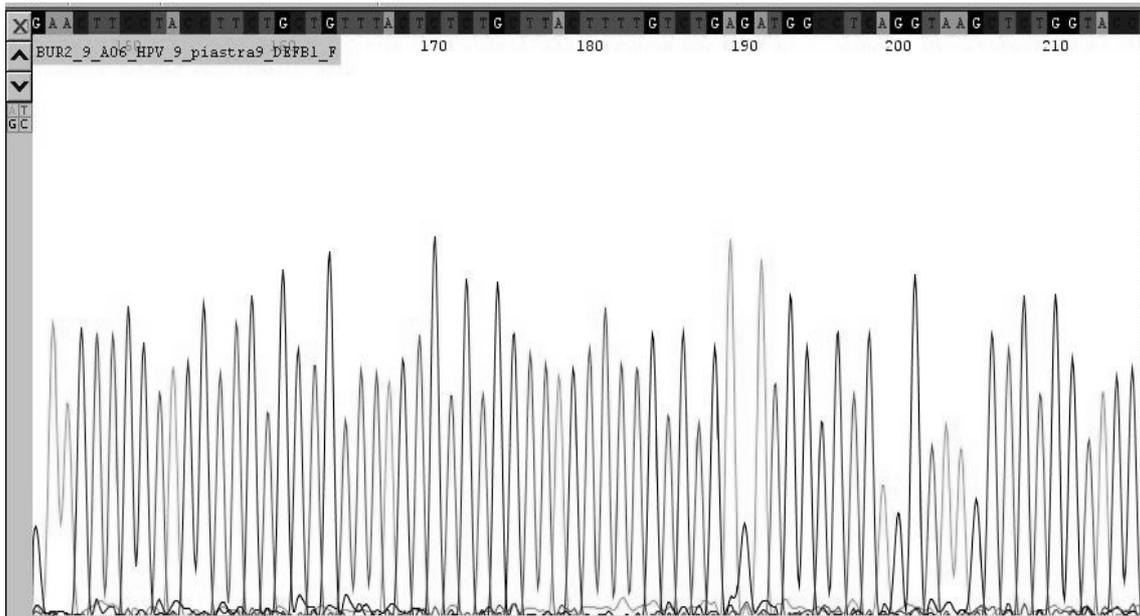


Figura 13 – Eletroferograma demonstrando os resultados obtidos através do procedimento de sequenciamento.

Tabela 7 – Sequência Consenso utilizada para comparar com as sequências das amostras e obter os Genótipos do gene *DEFB1*. Os polimorfismos nas posições -52, -44 e -20 e o códon de iniciação ATG estão marcados.

Sequência Consenso para o gene *DEFB1*

ctccagcctctggaagcctctgtcagctcagcctccaaag**G**agccagc**C**tctcccagttc
 ctgaaatcctg**G**gtgttgctgccagtcgcc**ATG**agaacttctaccttctgctgtttactctc
 tgcttactttgtctgagatggcctcaggtagctctggtacctgcaagagtttccatccc

As distribuições entre as frequências alélicas e genóticas para os três SNPs estudados, para o grupo de pacientes HPV positivos e o grupo controle, está apresentada na Tabela 8.

Tabela 8 - Frequências alélicas e genóticas do gene *DEFB1* em pacientes HPV+ e no grupo controle saudável.

SNPs do gene		HPV+ (%)	Controles (%)	<i>p</i> -value*	O.R.	I.C. 95%	X ²
<i>DEFB1</i>							
						0.723 -	0.124
rs1799946	G	173/320 (54%)	80/142 (56%)	0.6859	1.0960	1.667	
			62/142				
	A	147/320 (46%)	(44%)				
- 52 G/A	GG	39/160 (25%)	22/71 (31%)				
	GA	95/160 (59%)	36/71 (50%)	0.4375			1.5895
	AA	26/160 (16%)	13/71 (19%)				
			132/142			1.005 -	3.7073
rs1800972	C	273/320 (85%)	(93%)	0.0214	2.0474	4.525	
	G	47/320 (15%)	10/142 (7%)				
- 44 C/G	CC	117/160 (73%)	61/71 (86%)				
	CG	39/160 (24%)	10/71 (14%)	0.0793			4.3989
	GG	4/160 (3%)	0/71 (0%)				
			91/142			0.839 -	1.2173
rs11362	G	186/320 (58%)	(64%)	0.2579	1.2848	1.980	
			51/142				
	A	134/320 (42%)	(36%)				
- 20 G/A	GG	45/160 (28%)	27/71 (38%)				
	GA	96/160 (60%)	37/71 (52%)	0.3166			2.2563
	AA	19/160 (12%)	7/71 (10%)				

*Teste exato de Fisher.

Os dados referentes à Tabela 8 deixam evidentes as distribuições das frequências dos alelos e genótipos nos dois grupos. Os alelos selvagens foram mais frequentes para todos os polimorfismos.

Com relação ao polimorfismo **-52 G/A**, 39 (25%) amostras apresentaram o genótipo GG, 95 (59%) GA e 26 (16%) AA no grupo HPV positivo. Já no grupo controle, 22 (31%)

amostras apresentaram o genótipo GG, 36 (50%) GA e 13 (19%) AA. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas nas frequências genotípicas e alélicas para este polimorfismo (p value = 0.4375 e 0.6859, respectivamente).

Em relação ao polimorfismo **-20 G/A**, 45 (28%) amostras apresentaram o genótipo GG, 96 (60%) GA e 19 (12%) AA no grupo HPV positivo. No grupo controle, 22 (38%) amostras apresentaram o genótipo GG, 37 (52%) GA e 7 (10%) AA. Também não foram observadas diferenças estatísticas nas frequências genotípicas e alélicas para este polimorfismo (p value = 0.2579 e 0.3166, respectivamente).

Por fim, para o polimorfismo **-44 C/G**, 117 (73%) amostras apresentaram o genótipo CC, 39 (24%) CG e 4 (3%) GG no grupo HPV positivo. Para o grupo controle, 61 (86%) amostras apresentaram o genótipo CC, 10 (14%) CG e 0 (0%) AA. As frequências genotípicas apresentaram uma grande variação, mas as diferenças não foram estatisticamente significativas para este polimorfismo (p value = 0.0793). No entanto, verifica-se uma tendência grande em favor deste polimorfismo, e é possível que, ao aumentarmos o número de amostras, essa diferença passe a ser estatisticamente significativa.

O alelo -44C é muito mais frequente do que o alelo -44G, em ambos os grupos do estudo. As frequências alélicas deste polimorfismo apresentaram diferenças significativas (p value = 0.0214), e os resultados sugerem que o alelo -44G possa estar relacionado com a susceptibilidade à infecção pelo HPV de alto risco.

Na Tabela 9, podemos verificar as frequências alélicas e genotípicas do gene *DEFB1* em pacientes HPV positivos com lesão de baixo grau (LSIL) e alto grau (HSIL).

Tabela 9 - Frequências alélicas e genotípicas do gene *DEFB1* em pacientes HPV positivos com lesão de baixo grau (LSIL) e alto grau (HSIL).

SNPs do gene		HSIL (%)	LSIL (%)	p-value*	O.R.	I.C. 95%
<i>DEFB1</i>						
rs1799946	G	54/108 (50%)	119/212 (56%)	0.3428	1.2785	0.7825 – 2.0909
	A	54/108 (50%)	93/212 (44%)			
- 52 G/A	GG	11/54 (20%)	28/106 (27%)	0.5326		
	GA	32/54 (60%)	63/106 (59%)			
	AA	11/54 (20%)	15/106 (14%)			
rs180097			181/212			0.4918 –
2	C	92/108 (85%)	(85%) 31/212 (15%)	1	1.0153	2.0296
- 44 C/G	G	16/108 (15%)	%)	0.7305		
	CC	40/54 (74%)	77/106 (73%)			
	CG	12/54 (23%)	27/106 (25%)			
	GG	2/54 (3%)	2/106 (2%)			
rs11362	G	67/108 (62%)	119/212 (56%) 93/212 (44%)	0.3390	0.7836	1.2902
- 20 G/A	A	41/108 (38%)	%)	0.3711		
	GG	19/54 (35%)	26/106 (25%)			
	GA	29/54 (54%)	67/106 (63%)			
	AA	6/54 (11%)	13/106 (12%)			

*Teste exato de Fisher.

Os dados referentes à Tabela 9 deixam evidentes as distribuições das frequências dos alelos e genótipos no grupo de HPV positivos estratificado em HSIL e LSIL. Os alelos selvagens foram mais frequentes para todos os polimorfismos, exceto para o -52 G/A, em que as frequências alélicas foram idênticas entre si (54 amostras, ou 50%) para o grupo HSIL.

Com relação ao polimorfismo -52 G/A, 11 (20%) amostras apresentaram o genótipo GG, 32 (60%) GA e 11 (20%) AA no grupo HSIL. Já no grupo LSIL, 28 (27%) amostras apresentaram o genótipo GG, 63 (59%) GA e 15 (14%) AA. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas nas frequências genotípicas e alélicas para este polimorfismo (p value = 0.5326 e 0.3428, respectivamente).

Em relação ao polimorfismo -44 C/G, 40 (74%) amostras apresentaram o genótipo GG, 12 (23%) GA e 2 (2%) AA no grupo HSIL. No grupo LSIL, 77 (73%) amostras apresentaram o genótipo GG, 27 (25%) GA e 2 (2%) AA. Também não foram observadas diferenças estatísticas nas frequências genotípicas e alélicas para este polimorfismo (p value = 0.7305 e 1, respectivamente).

Por fim, para o polimorfismo -20 G/A, 19 (35%) amostras apresentaram o genótipo CC, 29 (54%) CG e 6 (11%) GG no grupo HSIL. Para o grupo LSIL, 26 (25%) amostras apresentaram o genótipo CC, 67 (63%) CG e 13 (12%) AA. Novamente, não foram observadas diferenças estatísticas significativas nas frequências genotípicas e alélicas para este polimorfismo (p value = 0.3711 e 0.3390, respectivamente).

A análise de dominância do SNP -44 C/G também foi realizada, avaliando ambos os alelos em relação à infecção e à progressão da lesão. No entanto, os resultados obtidos não foram significativos (p values > 0.05). Dessa forma, não foi possível afirmar que nenhum dos alelos pudesse desempenhar um maior fator de proteção nem de susceptibilidade quando em dominância. Até o momento, acredita-se não haver dados semelhantes publicados na literatura.

Embora seja possível a formação aleatória de 8 combinações de haplótipos dos SNPs do gene *DEFB1*, apenas 6 haplótipos foram encontrados em nossa população de estudo, sendo 6 nos pacientes HPV positivos e apenas 4 no grupo controle, como mostrado na Tabela 11. Os haplótipos mais frequentes foram os ACG, GCA e GGG, em ambos os grupos. Os haplótipos ACA e AGG não foram encontrados no grupo controle saudável, mas também foram pouco frequentes nos pacientes HPV positivos, juntamente com o haplótipo GCG.

Tabela 10 - Frequências dos haplótipos do gene *DEFB1* nos pacientes HPV+ e no grupo controle saudável.

Haplótipos do gene <i>DEFB1</i> (-52,-44,-20)	HPV+ (%)	Controle (%)
ACG	129/320 (40.3%)	62/142(43.7%)
GCA	116/320 (36.3%)	51/142 (35.9%)
GGG	45/320 (14.0%)	20/142 (14.1%)
ACA	17/320 (5.3%)	0/142 (0%)
GCG	11/320 (3.5%)	9/142 (6.3%)
AGG	2/320 (0.6%)	0/142 (0%)

**p*-value=0.0251

Foi constatada uma diferença significativa (p value = 0.0251) na distribuição de todos os haplótipos, ao comparar os dois grupos. Ao analisar cada haplótipo individualmente, verificou-se que apenas a frequência do haplótipo ACA apresenta uma diferença significativa entre os grupos (p value = 0.0051, p value corrigido = 0.0047). Este haplótipo se mostrou bem mais frequente no grupo de pacientes infectados, que apresentou 17 amostras (5,3%), estando ausente no grupo controle (0%)

Adicionalmente, foi feita uma comparação entre a população estudada (pacientes e controles) e outras populações de diversas etnias, avaliando as frequências dos SNPs estudados. Os resultados estão expostos na Tabela 11.

As frequências alélicas dos SNPs do gene *DEFB1* encontradas em nosso grupo de estudo, incluindo tanto os pacientes HPV positivos ($n = 160$) quanto o grupo controle ($n = 71$), são similares às de diversos grupos étnicos divulgados pelo HapMap (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP). Foi possível evidenciar que os SNPs -52G/A e -44C/G do grupo de estudo apresentaram maiores semelhanças em suas distribuições com o grupo étnico Han da China, enquanto o SNP -20 G/A apresentou maiores semelhanças com o grupo étnico japonês (Tabela 11).

As frequências de todos os SNPs se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg (p -value > 5%), como avaliado pelo teste do Qui-quadrado utilizando-se o software Genotype

Transposer.

Tabela 11 - Frequências dos polimorfismos do *DEFB1* entre populações de diversas etnias.

População / SNP	-52 G/A		-44 C/G		-20 G/A	
	G	A	C	G	G	A
João Pessoa (Brasil)	54.7%	45.3%	87.6%	12.4%	60.0%	40.0%
CEU (Europa)	60.3%	39.7%	77.8%	22.2%	66.7%	33.3%
HCB (China)	54.4%	45.6%	88.6%*	11.4%*	67%	33%
JPT (Japão)	48.9%	51.1%	88.6%*	11.4%*	62.5%	37.5%
YRI (África Sub-Saariana)	42.4%	57.6%	92%	8%	67.5%	32.5%

*Foram analisados em conjunto para este SNP.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, verificou-se uma maior frequência dos tipos virais 16, 18 e 33 entre as amostras HPV positivas. Estes resultados confirmam aqueles verificados por Rabelo-Santos et al. (2003) que verificaram que para a maior parte da população brasileira os tipos mais frequentes são os 16 e 18, seguidos de perto pelo HPV-33.

Quando analisada a relação entre a susceptibilidade à infecção por HPV de alto risco e os polimorfismos do gene *DEFB1*, verificou-se apenas uma diferença significativa em relação a frequência alélica de -44 C/G, ao comparar o grupo HPV positivo com o grupo controle saudável (p value = 0.0214; OR = 2,0474), o que sugere que o alelo G possa ser um marcador de risco para a infecção do HPV. Percebe-se uma grande diferença na frequência de indivíduos homocigotos -44 C/C, o que pode ser a causa dessa variação de distribuição. Os três genótipos também apresentaram uma distribuição bastante diferente, mas que não chegou a atingir uma diferença significativa (p value = 0.0793).

O alelo -44 C, localizado em uma região que é altamente conservada em outras espécies de primatas, já foi correlacionado com o risco de infecção por *Candida* spp. (JUREVIC, 2003), o que apóia fortemente um papel para esse polimorfismo na modulação da expressão do gene *DEFB1*. Dorschner et al. (2003) demonstraram que a Beta Defensina murina 1 (MBD-1), homólogo de hBD-1, é bastante expressa na pele embrionária e neonatal, e proporciona proteção contra infecções nas primeiras fases da vida.

Em contrapartida, a frequência do polimorfismo da região 5' UTR do *DEFB1* conferiu um aumento na susceptibilidade a infecção provocada pelo HPV. O alelo mutante G apresentou maior frequência nas pacientes HPV positivas (0,15) do que nas saudáveis (0,08). O padrão de expressão constitutivo da hBD-1 varia entre os indivíduos sendo modulado por polimorfismos presentes na região 5' UTR (JUREVIC *et al.* 2002). Os resultados obtidos apoiam esta análise inicial, assim como, com outros estudos que associam a hBD-1 com infecções (JUREVIC *et al.* 2002; BRAIDA *et al.* 2004). Braida *et al.* (2004) avaliaram o papel dos três SNPs na 5' UTR, porém apenas aquele localizado na posição -44 apresentou diferenças significativas nos pacientes infectados pelo HIV-1. No entanto, seus resultados se mostraram diferentes dos aqui apresentados. De acordo com

este estudo, o genótipo C/C provoca o aumento da susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 (O.R=3,6 1,89-6,90 para I.C. de 95%). Jurevic *et al.* (2002) também concluíram que existe uma forte associação entre o SNP -44 na proteção contra a infecção por *Candida*. Por sua vez, Boniotto *et al.* (2004) não encontraram associação deste polimorfismo com a EOP (do inglês, “early-onset periodontal disease”). Segat *et al.* (2010) também não encontraram associações deste gene com a dermatite atópica, mesmo com trabalhos controversos na literatura, como os relatados por Prado-Montes de Oca (2007) e Kim *et al.* (2009).

Este SNP também está associado com a proteção contra doença pulmonar obstrutiva crônica (HU, 2004) e transmissão vertical da infecção pelo HIV (BRAIDA, 2004; MILANESE, 2006; SEGAT, 2006), assim como a doença de Crohn (KOCSIS, 2008); enquanto que o número elevado de cópias do cluster dos genes de Beta-defensina está relacionado com o aumento do risco de psoríase (HOLLOX, 2008). Kalus *et al.* (2009) também apontam resultados interessantes que sugerem que o alelo -44 G está associado com o aumento da expressão do mRNA de hBD-3, confirmando a interação e o recrutamento desta proteína por hBD-1.

Por outro lado, verificamos que em relação às posições -52 G/A e -20 G/A, não houve diferenças significativas entre os grupos analisados. Braida *et al.* (2004) também encontraram uma associação apenas do SNP -44 com a infecção do HIV-1 numa população italiana. Já Milanese *et al.* (2006) apresentaram dados que relacionam o polimorfismo -52 G/A com o risco de infecção pelo HIV-1 em crianças brasileiras, excluindo o papel dos outros polimorfismos. Outros estudos já mencionados (BRAIDA *et al.*, 2004; SEGAT *et al.*, 2006; GUIMARÃES *et al.*, 2009) também não encontraram diferenças significativas para estes polimorfismos em outras doenças.

Também foi investigada a possível influência dos polimorfismos do gene *DEFB1* na progressão das neoplasias intraepiteliais cervicais causadas pelo HPV de alto risco, mas não foram observadas diferenças significativas (p values > 0.05) para nenhum dos genótipos ou alelos estudados. Apesar das frequências alélicas do SNP -44 C/G apresentarem uma grande diferença quando analisadas quanto à infecção, essa tendência não foi verificada ao considerar a progressão da lesão. As frequências alélicas para este polimorfismo foram exatamente iguais para pacientes com LSIL e HSIL (p value = 1).

Os haplótipos referentes ao gene *DEFB1* também apresentaram uma distribuição diferenciada, indicando uma variação entre os dois grupos, ao avaliar todos os haplótipos em conjunto (p-value = 0.0251). As frequências se mostraram bastante semelhantes para os haplótipos ACG, GCA, GGG, GCG e AGG (p values > 0.05), variando apenas para o haplótipo ACA. Essa diferença mostrou ser bastante significativa (p value = 0.0051, p value corrigido = 0.0047), indicando um caráter de susceptibilidade à infecção para este haplótipo.

Os estudos de Kalus et al. (2009) relacionaram o SNP -44G com mecanismos que estão associados com a susceptibilidade a diversas doenças. Vários fatores apontam para uma função de proteção, incluindo efeitos diretos, resultando em aumento da atividade antimicrobiana constitutiva de hBD-1 e hBD-3 e aumento dos efeitos imunomoduladores destas defensinas. De acordo com Feng et al, 2005, o maior nível constitutivo de hBD-1 e hBD-3 em indivíduos com o alelo -44G é compatível com a proteção de *Candida* oral e pode ser biologicamente importante para aumentar a resistência do epitélio para colonização por *Candida* porque hBD-3 possui uma forte atividade contra *Candida*. Da mesma forma, a proteção contra a doença pulmonar obstrutiva crônica (HU et al, 2004) e menor risco de infecção pelo HIV-1 em crianças nascidas de mães HIV-1 positivas (BRAIDA, 2004) associados com o alelo -44G podem estar relacionados a um aumento da expressão de hBD-3, que possui uma atividade antimicrobiana direta mais potente que a hBD-1, que possui propriedades anti-virais diretas bloqueando a replicação viral (QUIÑONES-MATEU, 2003).

No entanto, os resultados encontrados no presente trabalho tendem a associar o haplótipo ACA com a susceptibilidade à infecção do HPV, indo de encontro aos estudos acima citados. Mais uma vez, diversos estudos relatam que os SNPs -52, -44 e -20 podem contribuir tanto para a proteção quanto para a susceptibilidade a diferentes doenças, indicando a ação sinérgica que tais SNPs podem desempenhar no fenótipo (NASLAVSKY et al., 2009).

7. CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos com o sequenciamento dos polimorfismos -52 G/A, -44 C/G e -20 G/A da região 5' UTR do gene *DEFB1*, em amostras de pacientes HPV positivos e controles saudáveis, podemos concluir que diferenças significativas das frequências do SNP -44C/G entre os grupos estudados sugerem um papel de marcador de risco ao alelo G (p value = 0.0214; O.R. = 2,0474).

A análise através da distribuição dos SNPs entre os grupos de pacientes HPV positivos e de indivíduos não infectados permitiu evidenciar a importância de componentes da imunidade inata, que podem ter valor prognóstico e no desenvolvimento de terapias individualizadas no futuro.

Ao nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho a tentar associar os polimorfismos do gene *DEFB1* com a progressão da lesão provocada por HPV de alto risco, além de ser uma das primeiras descrições que associam os polimorfismos do gene *DEFB1* com o risco da infecção pelo HPV. Os resultados obtidos parecem excluir um papel para os SNPs -52 G/A, -44 C/G e -20 G/A na gravidade da lesão intraepitelial causada pelo HPV.

Nossos resultados podem contribuir para o desenvolvimento de terapias baseadas em peptídeos antimicrobianos sintéticos, de modo a prevenir e combater a infecção causada pelo HPV de alto risco. Além disso, o conhecimento do perfil genético do paciente poderá fornecer a base para, no futuro, direcionar o tratamento personalizado de doenças e assim melhorando a qualidade de vida da população.

8. REFERÊNCIAS

APGAR BS, ZOSCHNICK L, WRIGHT TC (November 2003). The 2001 Bethesda System terminology. *Am Fam Physician* 68 (10): 1992–8.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. *Current protocols in molecular biology*, New York: John Wiley , 2003. 4755 p.

BALS R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res.* 2000;1(3):141-50. Epub 2000.

BASEMAN JG, KOUTSKY, L. A. (2005) The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of clinical virology.* 32: 16-24.

BICK RJ, POINDEXTER BJ, BUJA LM, LAWYER CH, MILNER SM, BHAT S. Nuclear localization of hBD-1 in human keratinocytes. *J Burns Wounds* 2007;7:e3.

BOSCH FX, LORINCZ A, MUNOZ N, MEIJER CJ, SHAH KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002;55(4):244–265.

BRAIDA L, BONIOTTO M, PONTILLO A, TOVO PA, AMOROSO A, CROVELLA S. A single-nucleotide polymorphism in the human beta-defensin 1 gene is associated with HIV-1 infection in Italian children. *Aids.* 2004;18:1598–1600.

BRENNA, S. & SYRAJANEN, K. Regulation of cell cycles is of key importance in human papillomavirus (HPV)-associated cervical carcinogenesis. *São Paulo Medical Journal.* 121(3): 128-132. 2003.

BROOKES, A. J. The essence of SNPs. *Gene*, v.234, n.2, Jul 8, p.177-186. 1999.

BUCK CB, DAY PM, THOMPSON CD, LUBKOWSKI J, LU W, ET AL. (2006) Human alpha-defensins block papillomavirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1516–1521.

BULLARD, R. S., GIBSON W., BOSE S.K., BELGRAVE J.K., EADDY A.C., WRIGHT C.J., HAZEN-MARTIN D.J., LAGE J.M., KEANE T.E., GANZ T.A. & DONALD C.D. Functional analysis of the host defense peptide Human Beta Defensin-1: new insight into its potential role in cancer. *Mol Immunol*, v.45, n.3, Feb, p.839-848. 2008.

BURD, E.M. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Reviews*. 1-17. 2003.

CAGLIANI R, FUMAGALLI M, RIVA S, POZZOLI U, COMI GP, MENOZZI G, ET AL. The signature of long-standing balancing selection at the human defensin beta-1 promoter. *Genome Biol* 2008;9:R143.

Castellsague X, Bosch FX, Munoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* 2002;89:191-9

CASTRO, T.M.P.G.; NETO, C.E.R.; SCALA, K.A. E SCALA W.A. Manifestações orais associadas ao papilomavírus humano (HPV) conceitos atuais: revisão bibliográfica. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 70(4): 546-550. 2004.

CAVALCANTI, S.M.; FRUGULHETTI, I.C.; PASSOS, M.R.; FONSECA, M.E.; OLIVEIRA, L.H. Prevalence of human papillomavirus DNA in female cervical lesions from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 89(4): 575-80. 1994.

CHONG, K. T., et al. 2006. High level expression of human epithelial betadefensins (hBD-1, 2 and 3) in papillomavirus induced lesions. *Viol. J.* 3:75.

DE VILLIERS, E.M.; FAUQUET, C.; BROKER, T.R.; BERNARD, H.U.; ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 324, p.17–27, 2004.

DERCHAIN SFM, LONGATTO FILHO A, SYRJANEN KJ. (2005) – Neoplasia intra-epitelial cervical: diagnóstico e tratamento. Rev Bras Ginecol Obstet. 27(7):425-433.

DING J, CHOU YY, CHANG TL. Defensins in viral infections. J Innate Immun 2009;1:413–20.

DOORBAR J: Molecular biology of papillomavirus infection in the cervical cancer. Clin Sci Lon 2006, 110 (Suppl 5): 525-541.

DORSCHNER RA, LIN KH, MURAKAMI M, GALLO RL. Neonatal skin in mice and humans expresses increased levels of antimicrobial peptides: innate immunity during development of the adaptive response. Pediatr Res. 2003 Apr;53(4):566-72. Epub 2003.

DRAGANOV, P.; TODOROV, S.; TODOROV, I.; KARCHEV, T. E KALVATCHEV, Z. Identification of HPV DNA in patients with juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis using SYBR1 Green real-time PCR. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology 70: 469-473. 2006.

ELLERBROCK, T.V.; CHIASSON, M.A.; BUSH, T.J.; *et al.* Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women. JAMA, v.283, n°8, p. 1031-1037, 2000.

FENG Z, JIANG B, CHANDRA J, GHANNOUM M, NELSON S, WEINBERG A: Human beta-defensins: differential activity against candidal species and regulation by *Candida albicans*. J Dent Res 2005, 84(5):445-450

FERLAY J, SHIN HR, BRAY F, ET AL. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 [published online ahead of print June 17, 2010]. Int J Cancer. 2010.

GONÇALVES MAG , DONADI EA . Immune cellular response to HPV: Current concepts . Braz . J. Inf. Dis. 8(1): 1-9. 2004.

GONÇALVES, M.A.; MASSAD, E.; BURATTINI, M.N.; VILLA, L.L.; Relationship between

human papilomavírus (HPV) genotyping and genital neoplasia in HIV-positive patients of Santos City, São Paulo, Brazil. *Int. J. STD AIDS*. 10:803-807, 1999.

GOSTOUT, B.S.; ZANETTA, G.M; MALEEMONKOL, S.; KAMAT, M.R.; MCGOVERN, R.M. E PERSING, D.H. Differential distribution of sequence variations in HPV-16 E6. *Gynecologic Oncology*. 79:11-17. 1999.

GREENBLATT, R.J. Human Papillomaviruses: Diseases, Diagnosis, and a Possible Vaccine. *Clinical Microbiology Newsletter*. 27(18): 139-145. 2005.

GROPP R, FRYE M, WAGNER TO, BARGON J: Epithelial defensins impair adenoviral infection: implication for adenovirus mediated gene therapy. *Hum Gene Ther* 1999, 10:957-964

GUIMARÃES RL, SEGAT L, ROCHA CRC, BRANDÃO LAC, ZANIN V, ARAÚJO J, NASLAVSKY MS, LIMA FILHO JL, CROVELLA S. (2009) – Functional polymorphisms of *DEFB1* gene in type 1 diabetes Brazilian children. *Autoimmunology*. 42 (5): 306-313

HOLLOX EJ, HUFFMEIER U, ZEEUWEN PL, PALLA R, LASCORZ J, RODIJKOLTHUIS D, KERKHOF PC VAN DE, TRAUPE H, DE JONGH G, DEN HEIJER M, ET AL. Psoriasis is associated with increased beta-defensin genomic copy number. *Nat Genet*. 2008;40:23–25.

HOLLOX, E. J., ARMOUR J. A & BARBER J. C.. Extensive normal copy number variation of a beta-defensin antimicrobial-gene cluster. *Am J Hum Genet*, v.73, n.3, Sep, p.591-600. 2003.

HOOVER, D. M., O. CHERTOV & J. LUBKOWSKI. The Structure of Human Beta-Defensin-1. *Journal of Biological Chemistry*, v.276, n.42, October 19, 2001, p.39021-39026. 2001.

HORNE AW, STOCK SJ and KING AE. Innate immunity and disorders of the female

reproductive tract. *Reproduction*. 135(6):739-49. 2008.

HU RC, XU YJ, ZHANG ZX, NI W, CHEN SX. Correlation of *HDEFB1* polymorphism and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease in Chinese Han population. *Chin Med J (Engl)* 2004;117:1637–1641.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde - Brasil. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer de colo de útero, 2011. www.inca.org.br

JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, ET AL. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* 2009;59(4):225–249.

JUREVIC RJ, BAI M, CHADWICK RB, WHITE TC, DALE, BA. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in human beta-defensin 1: high-throughput SNP assays and association with in type I diabetics and nondiabetic controls. *Clin Microbiol .:* 90–96.

KALUS AA, FREDERICKS LP, HACKER BM, DOMMISCH H, PRESLAND RB, KIMBALL JR, ET AL. Association of a genetic polymorphism (-44 C/G SNP) in the human *DEFB1* gene with expression and inducibility of multiple beta-defensins in gingival keratinocytes. *BMC Oral Health* 2009;9:21.

KIM E, LEE JE, NAMKUNG JH, KIM PS, KIM S, SHIN ES, CHO EY, YANG JM. *J Dermatol Sci.* 2009 Apr;54(1):25-30. Epub 2009 Jan 9.

KLOTMAN, M. E. & T. L. CHANG. Defensins in innate antiviral immunity. *Nat Rev Immunol*, v.6, n.6, p.447-456. 2006.

KOCSIS AK, LAKATOS PL, SOMOGYVARI F, FUSZEK P, PAPP J, FISCHER S, SZAMOSI T, LAKATOS L, KOVACS A, HOFNER P, ET AL. Association of beta-defensin 1 single nucleotide polymorphisms with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol.* 2008;43:299–307.

KURMAN, R.J. & MALKASIAN, G.D.; SEDLIS, A.; SOLOMON, D. From Papanicolaou to Bethesda: the rationale for a new clinical cytologic classification. *Obstet. Gynecol.;* v.77, p.

779-782, 1991.

LAU, S.; FRANCO, E.L. Management of low-grade cervical lesions in young women. *CAMJ* 173-177. 2005.

LEHNER, T. Innate and adaptive mucosal immunity in protection against HIV infection. *Vaccine*. 21(2):S68-76. 2003.

LORENZATO, F.; HO, L.; TERRY, G.; SINGER, A.; SANTOS, L.C.; BATISTA, R.L.; LUBAMBO, T. The use of papillomavirus typing in detection of cervical cancer. *Int J of Gynecol Cancer*. 10:143-150, 2000.

LOWY DR, HOWLEY PM: Fields virology. In: *Knipe DM, Howley PM, editors. Papillomaviruses*. Philadelphia, USA: Lippincott, Williams and Wilkins; 2001: 2231–64.

MACHADO, P. R. L., M. I. A. S. ARAÚJO, L. CARVALHO & E. M. CARVALHO. Mecanismos de resposta imune às infecções. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.79, p.647-662. 2004.

MAGGI, R.; ZANNONI, E.; GIORDA, G.; BIRAGHI, P.; SIDERI, M. Comparison of repeat smear, colposcopy, and colposcopically directed biopsy in the evaluation of the mildly abnormal smear. *Gynecol Oncol.*, v. 35, p. 294-296, 1989.

MAGNADOTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol*, v.20, n.2, Feb, p.137-51. 2006.

McCRAY PB, BENTLEY L. Human airway epithelia express a betadefensin. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 16 (3): 343–9.1997

MÉNDEZ-SAMPERIO P. Role of antimicrobial peptides in host defense against mycobacterial infections, *Peptides* 29:1836–1841. 2008.

MILANESE M, SEGAT L, PONTILLO A, ARRAES LC, DE LIMA FILHO JL, CROVELLA S. *DEFB1* gene polymorphisms and increased risk of HIV-1 infection in Brazilian children. *AIDS* 2006; 20: 1673–5

MONTOYAMA, S.; LADINES-LLAVE, C.A.; VILLANUEVA S. E TAKESHI. T. The role of Human Papilloma Virus in the molecular biology of cervical Carcinogenesis. *J. Med. Sci.* 50:1-19. 2004.

MUÑOZ N, CASTELLSAGUÉ X, DE GONZÁLEZ AB, GISSMANN L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006 Aug 31;24 Suppl 3:S3/1-10. Epub 2006 Jun 23.

NASCIMENTO, A. A. C.; ESPREAFICO, E. M.; LARSON, M. L. P.; MONESI, N.; ROSSI, N. M. M.; RODRIGUES, V. *Tecnologia do DNA recombinante*. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 1999. 85 p. Apostila.

NASLAVSKY MS, CROVELLA S, LIMA FILHO JL, ROCHA CR. The sound of silence: human beta-defensin-1 gene untranslated SNPs change the predicted mRNA secondary structure in a length-dependent manner. *Immunol Lett*. 2010 Mar 10;129(1):53-5. Epub 2010 Jan 12.

NICOLAU, S, M. Peniscopía. In: HALBE H. W, *Tratado de ginecología*, 3ed, São Paulo: Roca,. p.531-539, v.1. 2000.

NORONHA, V.; MELLO, W.; VILLA, L.; BRITO, A.; MACEDO, L.; BISI, F.; MOTA, R.; SASSAMOTO, K.; MONTERIO, T.; LINHARES, A. Human papillomavirus associated with uterine cervix lesions. *Rev Soc Bras Med Trop*. 32(3): 235-40. 1999.

OLIVEIRA MC , SOARES RC , PINTO LP , COSTA A. HPV e carcinogênese oral ; revisão bibliográfica . *Rev . Bras. Otorrinolaringol*. 69(4) : 553-559. 2003.

PANTELIS A, WENGHOEFER M, HAAS S, MERKELBACH-BRUSE S, PANTELIS D, JEPSEN S, ET AL. Down regulation and nuclear localization of human beta-defensin-1 in pleomorphic adenomas of salivary glands. *Oral Oncol* 2009;45:526–30.

PAZGIER M, HOOVER DM, YANG D, LU W, LUBKOWSKI J. Human beta-defensins. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:1294–313.

PEREYRA, E. A. G; GUERRA, D. M. M; VILLA, L. L. Papilomavíruses humanas, In: R. VERONESI, R, FOCACCIA, Tratado de infectologia, 2ed. São Paulo: Atheneu,2004. p.479-485.

PETRY, K.U.; SCHEFFEL, D.; BODE, U.; et al. Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions. *Int. J. Cancer*, v.57, p. 836-840, 1994.

PINTO, A. P; TULIO, S; CRUZ, O. R. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical. *Revista da Associação de Medicina Brasileira*. v.48, n.1, p.73-78, jan.mar. 2002.

POPPE, W.A.; DRIJKONINGEN, M.; IDE, P.S.; LOWERINS, J.M.; VAN ASSCHE, F.A. Langerhans' cells and L1 antigen expression in normal and abnormal squamous epithelium of the cervical transformation zone. *Gynecol. Obstet. Invest.*, Basel, v. 41, nº3, p. 207-13, 1996.

PRADO-MONTES DE OCA, 2010. Beta-defensin 1: A restless warrior against allergies, infections and cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42; 2010; 800–804

PRADO-MONTES DE OCA E, GARCIA-VARGAS A, LOZANO-INOCENCIO R, GALLEGOS-ARREOLA MP, SANDOVAL-RAMIREZ L, DAVALOS-RODRIGUEZ NO, FIGUERA LE. Association of beta-defensin 1 single nucleotide polymorphisms with atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;142:211– 218.

PRADO-MONTES DE OCA E, VELARDE-FELIX JS, RIOS-TOSTADO JJ, PICOS-CARDENAS VJ, FIGUERA LE. SNP 668C (-) alters a NF-kappaB1 putative binding site in non-coding strand of human beta-defensin 1 (*DEFB1*) and is associated with lepromatous leprosy. *Infect Genet Evol* 2009;9:617–25

QUIÑONES-MATEU ME, LEDERMAN MM, FENG Z, CHAKRABORTY B, WEBER J, RANGEL HR, al. Epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication. *AIDS* 2003,17 :F39–F48.

RABELO-SANTOS, S.H.; ZEFERINO, L.; VILLA, L.L.; SOBRINHO, J.P.; AMARAL, R.G.; MAGALHÃES, A.V. Intraepithelial neoplasia III and invasive cervical câncer from Goiânia, Brazil. *Mem Ins Oswaldo Cruz*. 98(2):181-184. 2003.

RAFATPANAH, H., R. FARID, G. GOLANBAR & F. JABBARI AZAD. HTLV-I Infection: virus structure, immune response to the virus and genetic association studies in HTLV-I-infected individuals. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, v.5, n.4, Dec, p.153-166. 2006.

RAJ, P.A. & DENTINO, A.R. Current status of Defensin and their role in innate and adaptative immunity. *Microbiology Letters*. 206:9-18. 2002.

RISCH, N. J. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature*, v.405, n.6788, Jun 15, p.847-856. 2000.

RODEN, R.B.S. E WU, T-C. Vaccination to prevent and treat cervical cancer. *Human Pathology*. 35(8):971-982. 2004.

SAINI R, KHIM TP, RAHMAN SA, ET AL. High-risk human papillomavirus in the oral cavity of women with cervical cancer, and their children. *Virol J*. 2010;7:131.

SARAIYA M, BERKOWITZ Z, YABROFF KR, ET AL. Cervical cancer screening with both human papillomavirus and Papanicolaou testing vs Papanicolaou testing alone: what screening intervals are physicians recommending? *Arch Intern Med*. 2010;170(11):977–

985.

SCHENK M AND MUELLER C. The mucosal immune system at the gastrointestinal barrier. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 22(3):391-40. 2008.

SEGAT L, GUIMARÃES RL, BRANDÃO LA, ROCHA CR, ZANIN V, TREVISIOL C, DE LIMA FILHO JL, CROVELLA S. Beta defensin-1 gene (*DEFB1*) polymorphisms are not associated with atopic dermatitis in children and adolescents from northeast Brazil (Recife, Pernambuco). *Int J Dermatol.* 2010 Jun;49(6):653-7.

SEGAT L, MILANESE M, BONIOTTO M, CROVELLA S, BERNARDON M, COSTANTINI M, ALBERICO S. DEFB-1 genetic polymorphism screening in HIV- 1 positive pregnant women and their children. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2006;19:13–16.

SELLORS, J.W.; SANKARANARAYANAN, D. R. Colposcopia e tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical. Edited by R. Sankaranarayanan and Ramani S. Wesley. p. 52-80, 2004.

SIERRA, S., B. KUPFER, ET AL. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J Clin Virol*, 34(4):233-44. 2005.

SOLOMON D, BREEN N, MCNEEL T. Cervical cancer screening rates in the United States and the potential impact of implementation of screening guidelines. *CA Cancer J Clin.* 2007;57(2):105–111.

SOLOMON, D. The 1988 Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. Developed and approved at the National Cancer Institute Workshop, Bethesda, Maryland, USA, December, 12-13. *Acta. Cytol.*, v.33, p.567-574, 1989.

SOLOMON, D.; DAVEY, D.; KURMAN, R.; MORIARTY, A.; O'CONNOR, D.; PREY, M. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA.* Apr. 24, nº287, v.16, p.2114-2119, 2002.

STANLEY, M. Immune responses to human papillomavirus. *J. Vac.* 5674:1-7. 2005.

STANLEY, M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecologic. Onc.* n. 109, p.S15 – S21, 2008.

SYVANEN, A. C. Toward genome-wide SNP genotyping. *Nat Genet*, v.37 Suppl, Jun, p.S5-10. 2005.

TYRING, S.K.; Human papillomavirus infections: Epidemiology, pathogenesis, and host immune response. *J. Am. Acad. Dermatol.* 43(1):S18-S26. 2000.

VALORE EV, PARK CH, QUAYLE AJ, WILES KR, MCCRAY PB JR, GANZ T (1998). Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest* 101:1633 -1642.

WALLIS, R.(2003). Structural Basis for Mannose-Binding Protein Function in Innate Immunity. *Immunobiology of Carbohydrates.* 1-12.

YANG, D., O. CHERTOV, S. N. BYKOVSKAIA, Q. CHEN, M. J. BUFFO, J. SHOGAN, M. ANDERSON, J. M. SCHRODER, J. M. WANG, O. M. HOWARD & J. J. OPPENHEIM. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*, v.286, n.5439, Oct 15, p.525-528. 1999.

ZHENG, ZHI-MING E BAKER, CARL C. Papillomavirus Genome Structure, Expression, and Post-Transcriptional Regulation. *National Institute of health.* 11: 2286-2302. 2006.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and Cancer: from Basic Studies to Clinical Application. *Nature Publishing Group.* (2). 2002.