

AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DESENCADEADA PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Fundação Antonio Prudente
Ana Maria Rodrigues Alves Romão
Coordenadora Pós-Graduação

PATRICIA THOMANN

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Doutor em
Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Luisa Lina Villa

**São Paulo
2005**



FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo**

Thomann, Patricia

**Avaliação da dinâmica da resposta imune humoral desencadeada pelo
papilomavírus humano / Patricia Thomann -- São Paulo, 2005.**

131p.

Tese(doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Luisa Lina Villa

Descritores: 1. PAPILOMAVIRUS/imunologia. 2. ANTICORPOS/análise.
3.CÂNCER CERVICAL/epidemiologia. 4.INFECCÕES CAUSADAS POR VIRUS
5. SOROLOGIA/métodos. 6. TESTES DE NEUTRALIZAÇÃO/métodos.

Histórico Escolar

Curso de Pós-Graduação em Ciências da Fundação Antônio Prudente - Área: Oncologia

Dados do Aluno:

PATRICIA THOMANN

Nível: DOUTORADO

Orientador LUISA LINA VILLA

Total Geral de Créditos: 10

Data de ingresso 08/02/01

Data de Conclusão (Defesa): 08/04/05

Título do Trabalho: Avaliação da Dinâmica da Resposta Imune Humoral Desencadeada pelo Papilomavírus Humano

Disciplina	Período		Carga Horária	Freq.	Créditos	Situação	Conc.
	Início	Término					
HCCC00006 GENÉTICA MOLECULAR DO CÂNCER	05/08/02	03/10/02	60	83%	5	Aprovado	A

Disciplinas Cursada em Outras Instituições Validadas pela CPG

Disciplina	Local	Carga Horária	Freq.	Créditos	Conc.
EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER	FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA DA USP	20	100%	1	A
NOVAS ABORDAGENS CLÍNICAS E MOLECULARES VOLTADAS PARA O CÂNCER	FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE - HOSPITAL DO CÂNCER	48	100%	4	A

São Paulo, 08 de Abril de 2005.

A Comissão Julgadora considerou o candidato aprovado.


DRA. LUISA LINA VILLA


DRA. CÉLIA REGINA WHITAKER CARNEIRO


DR. LUIZ FERNANDO LIMA REIS


DRA. SOPHIE FRANÇOISE MAURICETTE DERCHAIN


DR. JOÃO RENATO REBELLO PINHO


Fundação Antônio Prudente
LUIZ FERNANDO LIMA REIS
Coordenador de Pós-Graduação

Conceito:

A - Excelente; B - Bom; C - Regular; D - Reprovado; E - Excluído

Um (1) Crédito equivale a Doze (12) horas de atividades programadas

Mantido pela **Fundação Antonio Prudente** - Rua Prof. Antonio Prudente, 211 - Liberdade

São Paulo - SP - CEP 01509-900 - Fone/Fax: 11 3272-5113

Internet: www.hcanc.org.br - e-mail: posgrad@hcancer.org.br

DEDICATÓRIA

À minha mãe, **Irene** (*in memoriam*) que, com sua força, determinação e justiça, ensinou-me desde muito pequena que eu sou importante, devendo fazer o que me agrada com responsabilidade, assumindo as conseqüências dos meus atos e procurando sempre ver o lado melhor de todas as pessoas. **Mãe**, sem a sua dedicação e amor, eu jamais conseguiria chegar onde estou hoje. Você sempre foi mais do que minha mãe, foi minha melhor amiga! Se eu me tornar, algum dia, o mesmo tipo de mãe que você foi para mim, saberei que posso me considerar motivo de orgulho para você.

Ao meu pai, **Werner** (*in memoriam*) que, com sua retidão de caráter, honestidade e responsabilidade, me exemplificou como a dedicação integral ao trabalho sempre rende frutos mais saborosos do que a ociosidade, e que o maior tesouro de um indivíduo é poder viver dignamente e em paz, sem deixar de ser querido por todos aqueles que cruzarem o seu caminho. **Pai**, se não fosse a sua idéia de que a maior herança que um pai pode deixar aos filhos é a educação e a cultura, eu não teria sido capaz de vencer mais essa etapa. Você foi o melhor exemplo de que não é o meio que faz o homem e teve a grandeza de conseguir construir uma família que o ama e respeita, apesar da sua infância dolorosa. Tomara que eu tenha herdado a sua coragem para sempre seguir adiante.

AGRADECIMENTOS

À minha irmã, Karin, pelos bons conselhos, apoio, carinho e preocupação durante a caminhada rumo a mais etapa.

Ao meu irmão Beto, à minha cunhada Márcia e à minha sobrinha Renata, pelo apoio, preocupação e vontade de ajudar constante e pelo convívio diário.

A Dra. Luisa Lina Villa, por ter me aceito em seu grupo de pesquisa, confiado no meu potencial e investido em mim. Graças à sua orientação segura e a todas as oportunidades que a sra. proporcionou, tenho certeza de que me tornei não somente uma boa pesquisadora, mas também um ser humano melhor. O exemplo da sua competência profissional, aliada a generosidade e calor humano, certamente me marcou por toda a vida.

Ao Dr. Ricardo Renzo Brentani, diretor do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer e do Hospital do Câncer, por permitir que eu utilizasse as dependências desses dois locais para me aprimorar profissionalmente.

Ao Dr. Eduardo L. Franco, cujo vasto conhecimento em muito contribuiu para o desenvolvimento desse trabalho. Em especial, agradeço a imensa oportunidade por ele proporcionada de que eu pudesse participar da análise epidemiológica dos meus dados em seu laboratório, na Divisão de Epidemiologia, Departamento de Oncologia Clínica, Universidade McGill, Montreal, QC, Canadá.

A Dra. Kathryn Jansen, pesquisadora-chefe da Merck Research Laboratories, West Point, PA, USA, pela concessão das *virus-like particles* (VLP) que foram utilizadas como antígenos nos ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA que constam deste trabalho e pela profícua e contínua colaboração profissional e pessoal.

À Diana Pastrana, Chris Buck, Susana e, em especial ao Dr. John Schiller, chefe do Laboratório de Oncologia Celular, no Instituto Nacional do Câncer, no Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, MD, USA, por toda a paciência e empenho em transferir a tecnologia do ensaio de neutralização de pseudovirions aqui descrita e por terem feito com que eu me sentisse em casa durante o período de estágio em que lá estive.

Ao Dr. Neil Christensen, professor e pesquisador da Universidade de Pensilvânia (UPenn), Filadélfia, PA, USA, pela generosa concessão dos anticorpos monoclonais gerados contra epítomos conformacionais dos capsídios de HPV-16, que foram utilizados como controles nos ensaios de neutralização de pseudovirions de HPV-16.

Ao Dr. Salah Mahmud, pela amizade e auxílio inestimável na confecção das análises estatísticas e epidemiológicas presentes nessa tese. À Cândida Pizzolongo, assistente do Dr. Eduardo L. Franco, por ter sido uma verdadeira mãe para mim no período em que estive realizando as análises epidemiológicas dos meus dados.

Ao Dr. Alex Ferenczy, pela inestimável contribuição prestada ao estudo prospectivo Ludwig/McGill sobre os fatores de risco predisponentes à

infecção pelo HPV e ao desenvolvimento de neoplasias cervicais HPV-induzidas por meio da criteriosa revisão dos resultados de Citologia Oncológica derivados deste estudo.

Ao João Candeias, por ter me auxiliado no domínio de algumas das técnicas imunológicas dessa tese com toda a sua gentileza, calma e paciência; e por ter me recebido tão bem quando aqui cheguei e por ter me aceito no seu círculo de amigos.

Ao Paulinho (Paulo César Maciag), pelas discussões extremamente profícuas sobre a resposta imune do HPV, e pela excelente convivência no laboratório.

Ao pessoal do Laboratório de Virologia do Instituto Ludwig: Aline, Andréa, Carina Lara, Laura, Katiana, Enrique, Patrícia Sávio, Tatiana Joãozinho, Neide, Zé Carlos, Rômulo, Raquel, Antonieta, Maria Cecília pelas divertidas horas passadas no laboratório e pelos diversos tipos de ajuda, tanto no sentido profissional quanto no pessoal.

À Stella que, com sua calma e eficiência, sempre resolve as confusões em que nos envolvemos com bolsas, reservas técnicas e burocracias em geral, com um sorriso no rosto e uma palavra gentil no coração.

A todos do Instituto Ludwig, que de uma forma ou de outra contribuíram no cotidiano para a finalização deste trabalho. Em especial, para o pessoal dos outros laboratórios pela boa-vontade perene em

responder perguntas, ensinar técnicas novas e mostrar o funcionamento de equipamentos.

A todo os funcionários da biblioteca do Hospital A.C. Camargo, em especial a Rose e a Sueli, por toda a boa vontade em atender aos nossos pedidos de livros e artigos científicos, e pelo trabalho de revisão de tese.

À Ana Maria, coordenadora, e à Márcia, da Secretaria de Pós-Graduação da Fundação Antonio Prudente, pela paciência em responder mil vezes às mesmas perguntas, em resolver as nossas confusões com a burocracia e, enfim, pelo apoio fundamental.

À FAPESP, pelo suporte fundamental para esta pesquisa, por meio do processo número 00/13973-7, que vigorou desde abril de 2001 até abril de 2005.

Ao NIH, pelo auxílio financeiro.

Ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer e à Comissão de Pós-Graduação da Fundação Antonio Prudente cujo suporte financeiro imprescindível propiciou o aprendizado da técnica, a análise dos resultados e a divulgação dos mesmos no exterior.

RESUMO

Thomann P. **Avaliação da dinâmica da resposta imune humoral desencadeada pelo papilomavírus humano.** São Paulo; 2005. [Tese de Doutorado-Fundação Antonio Prudente].

Os anticorpos neutralizantes são cruciais na proteção contra doenças virais mediadas por vacinação. A elevada proteção adquirida contra infecções persistentes causadas pelo papilomavírus humano, por meio da imunização de mulheres com capsídios vazios de HPV-16, é conferida por este tipo de anticorpos. Os anticorpos neutralizantes detectados em amostras séricas de mulheres vacinadas foram capazes de neutralizar variantes divergentes de HPV-16. Ademais, sua detecção foi observada tanto em amostras séricas provenientes de mulheres vacinadas quanto naquelas coletadas de mulheres não vacinadas, em ensaios de neutralização de pseudovirions de HPV. Pouco se sabe, entretanto, sobre a indução de anticorpos neutralizantes por infecções HPV-induzidas entre mulheres não vacinadas e o suposto papel deste tipo de anticorpos durante o curso natural de uma infecção por HPV. Neste trabalho detectaram-se anticorpos neutralizantes em amostras séricas obtidas de mulheres não vacinadas participantes de um estudo sobre os fatores de risco para o desenvolvimento de infecções pelo HPV e das neoplasias cervicais. O impacto da presença deste tipo de anticorpos foi analisado por meio das principais manifestações virais durante o curso natural da infecção pelo HPV. A eficácia dos anticorpos

neutralizantes foi comparada com a sororeatividade de imunoglobulinas totais de classe G, detectada por meio do ensaio de ELISA, em uma amostragem constituída por 150 amostras séricas coletadas à admissão do estudo. A eliminação de infecções HPV-16 induzidas não pareceu ter sido facilitada pela presença de altos níveis de nenhum dos tipos de anticorpos reativos a HPV-16 (anticorpos neutralizantes – OR: 0,64 [IC95%: 0,16-2,58] X ELISA – OR: 0,64 [IC 95%: 0,19-2,16]). Pacientes portadoras de títulos de anticorpos neutralizantes equivalentes à diluição 640 ou superiores apresentaram elevados riscos para a detecção dos seguintes resultados virais: infecção cumulativa causada pelo HPV-16 (OR: 6,24 [IC95%: 0,88-270,1]), persistência da infecção causada por HPV-16 (OR: 5,17 [IC95%: 1,50-17,83] até OR: 27,33 [IC95%: 2,02-1376,6], de acordo com a categoria de referência utilizada – resultados de infecções transientes ou resultados negativos, respectivamente), aquisição de novas infecções causadas pelo HPV-16 (OR: 3,45 [IC95%: 0,17-207,2]) e elevadas cargas virais de HPV em geral (OR: 4,05 [IC95%: 1,05-15,66]). Essas correlações não foram encontradas para os anticorpos detectados por meio de ELISA. Logo, títulos de anticorpos neutralizantes equivalentes à diluição 640 ou superiores atuam como marcadores extremamente específicos da infecção causada pelo HPV-16 durante o curso da história natural das infecções pelo HPV.

SUMMARY

Thomann P. **[Evaluation of the dynamics of the humoral immune response triggered by human papillomavirus]** São Paulo; 2005. [Tese de Doutorado-Fundação Antonio Prudente].

Neutralizing antibodies (NAb) are crucial for vaccine-mediated protection against viral diseases and presumably play the key role in the high degree of protection from persistent papillomavirus infection seen after virus-like particles (VLP) vaccination in recent clinical trials. Neutralizing antibodies detected in serum samples of HPV-16 VLP vaccinated women were able to neutralize divergent variants of HPV-16 and their detection was achieved for serum samples collected from both vaccinated and non-vaccinated women through a HPV pseudovirus neutralization assay. However, little is known about the induction of NAb after genital HPV infections among non-vaccinated women and the putative role that these antibodies could play during the natural course of HPV infections. This work looked for HPV-16 NAbs in serum samples obtained from non-vaccinated women participating of a study for HPV infection and neoplasia risk factors. The impact of NAbs presence was analyzed through viral major outcomes during the natural course of HPV infection. The efficiency of Nabs was compared to HPV VLP ELISA seroreactivity in a 150 serum samples casuistic obtained at the enrollment of the study. The clearance of HPV-16 infection did not appear to be improved by the presence of high titers of any kind of anti-HPV-16

antibodies (Nabs – OR: 0,64 [CI 95%: 0,16-2,58] X ELISA –)R: 0,64 [CI95%: 0,19-2,16]). Women with neutralizing antibodies titers equal or superior to 640 dilutions showed higher risks of harboring the following HPV outcomes: cumulative HPV-16 infection (OR: 6,24 [CI95%: 0,88-270,1]), persistence of HPV-16 infection (OR: 5,17 [CI95%: 1,50-17,83] to OR: 27,33 [CI95%: 2,02-1376,6], according to the reference category used – transient or negative results, respectively), acquisition of new HPV-16 infection (OR: 3,45 [CI95%: 0,17-207,2]) and higher HPV viral load (OR: 4,05 [CI95%: 1,05-15,66]). The same was not observed for women with higher titers of HPV-16 VLP seroreactivity. Neutralizing antibodies titers equal or superior to the 640 dilution play an important role as highly specific markers for HPV-16 infection during HPV natural history course.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	ELISA –VLP para a detecção de anticorpos da classe IgG gerados contra o HPV-16	41
Figura 2	Esquema simplificado da produção de pseudovirions de HPV-16 e de BPV-1	42
Figura 3	Esquema simplificado do ensaio de neutralização de pseudovirions de HPV-16	43
Figura 4	Esquema de uma placa de ensaio de neutralização de pseudovirions de HPV-16	44
Figura 5	Esquema do plasmídio pÜL1B	46
Figura 6	Esquema do plasmídio pÜL2	48
Figura 7	Esquema do plasmídio pSHELL	50
Figura 8	Esquema do plasmídio pYSEAP	53
Figura 9	Comparação entre a detecção de diversos títulos de anticorpos neutralizantes de HPV-16 e a detecção de sororeatividade em ELISA – VLP para HPV-16 definida por diferentes percentis em um mesmo grupo de mulheres à admissão ao estudo	71

Figura 10	Prevalência da detecção do DNA de HPV-16 dentre as mulheres portadoras de variados títulos de anticorpos neutralizantes contra o HPV-16 à admissão ao estudo	73
Figura 11	Prevalência cumulativa da detecção do DNA de HPV-16 dentre as mulheres portadoras de variados títulos de anticorpos neutralizantes contra o HPV-16 à admissão ao estudo	74
Figura 12	Avaliação da especificidade do ensaio de neutralização de pseudovírus de HPV-16 em detectar infecções causadas pelo HPV-16	75
Figura 13	Avaliação da especificidade do ensaio de ELISA-VLP para HPV-16 em detectar infecções causadas pelo HPV-16	76
Figura 14	Avaliação da especificidade de ambas as medidas sorológicas	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Mapa físico do plasmídeo pÜL1B	45
Tabela 2	Mapa físico do plasmídeo pÜL2	47
Tabela 3	Mapa físico do plasmídeo pSHELL	49
Tabela 4	Mapa físico do plasmídeo pYSEAP	51
Tabela 5	Determinação arbitrária do <i>cut-off</i> (box vermelho) para o ensaio de neutralização de pseudovírus de HPV-16, de acordo com a detecção de DNA de HPV-16	54
Tabela 6	Comparação entre a detecção do DNA de HPV-16 por PCR e a detecção de anticorpos da classe IgG reativos contra VLP de HPV-16 à admissão ao estudo.	69
Tabela 7	Comparação entre a detecção do DNA de HPV-16 por PCR e a detecção de anticorpos neutralizantes anti-pseudovírus de HPV-16 à admissão ao estudo.	69
Tabela 8	Detecção de anticorpos circulantes da classe IgG reativos contra VLP de HPV-16 <i>versus</i> a detecção de anticorpos neutralizantes contra pseudovírus de HPV-16 à admissão ao estudo	70

Fundação Antonio Prudente
Arquivo - Antepositos Ant. e Bioméd.
Geografia - Pós-Graduação



Tabela 9	Detecção de anticorpos neutralizantes contra pseudovirions de HPV-16 <i>versus</i> a detecção de anticorpos circulantes da classe IgG reativos contra VLP de HPV-16 à admissão ao estudo	70
Tabela 10	Avaliação da detecção dos títulos de anticorpos neutralizantes contra o HPV-16 em amostras provenientes de um mesmo grupo de pacientes, coletadas em dois momentos no tempo: à admissão e após um ano de seguimento do estudo	72
Tabela 11	Avaliação da detecção de anticorpos neutralizantes anti-pseudovirions de HPV-16 e de anticorpos reativos a VLP de HPV-16 em relação à evolução da infecção pelo HPV-16	78
Tabela 12	Avaliação da habilidade do ensaio de neutralização de pseudovirions e do ELISA em discriminar mulheres portadoras de infecções persistentes pelo HPV-16 daquelas consistentemente negativas ou das portadoras de infecções transientes pelo HPV-16, ao longo do primeiro ano de seguimento do estudo	79
Tabela 13	Avaliação da habilidade do ensaio de neutralização de pseudovirions e do ELISA em discriminar: 1. mulheres portadoras de infecções incidentes pelo HPV-16 daquelas consistentemente negativas ao longo do primeiro ano de seguimento do estudo e 2. mulheres que tiveram a eliminação da infecção pelo HPV-16 após quatro meses da admissão ao estudo daquelas em que houve persistência da infecção.	80

Tabela 14	Avaliação da habilidade do ensaio de neutralização de pseudovírions em discriminar mulheres portadoras de infecções pelo HPV-16 com elevada carga viral daquelas portadoras de baixa carga viral, ao longo do primeiro ano de seguimento do estudo	81
Tabela 15	Avaliação da habilidade do ensaio de ELISA em discriminar mulheres portadoras de infecções pelo HPV-16 com elevada carga viral daquelas portadoras de baixa carga viral, ao longo do primeiro ano de seguimento do estudo	81
Tabela 16	Carga viral de HPV, de acordo com os resultados de detecção de anticorpos neutralizantes de pseudovírions de HPV-16, por meio do ensaio de neutralização de pseudovírions	82

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	<i>alanine aminotransferase</i> ou alanina-aminotransferase.
ASCUS	<i>atypical squamous cells of undetermined significance</i> ou células atípicas de significado indeterminado.
BSA	<i>bovine serum albumine</i> ou albumina sérica bovina.
CMV	<i>cytomegalovirus</i> ou citomegalovírus.
CO₂	dióxido de carbono.
CsCl	cloreto de cério.
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> ou meio de Eagle modificado por Dulbecco.
DNA	ácido desoxirribonucleico
DO	densidade óptica.
D-PBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> ou salina fosfato tamponada de Dulbecco.
DST	doenças sexualmente transmissíveis
EF1α	<i>enhancer factor 1 α</i> .
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> ou ensaio imunoenzimático ligado a enzimas
H₂O₂	<i>hydrogen peroxide</i> ou peróxido de hidrogênio.

H₂SO₄	<i>sulfuric acid</i> ou ácido sulfúrico.
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> ou vírus da imunodeficiência humana.
HLA	<i>human leukocyte antigen</i> ou antígeno leucocitário humano.
HPV	<i>human papillomavirus</i> ou papilomavírus humano
HSIL	<i>high grade squamous intraepithelial lesion</i> ou lesão intraepitelial escamosa de alto grau
HTLV-1	<i>human T cell lymphotropic virus 1</i> ou vírus linfotrófico da célula T humana.
IC	intervalo de confiança
IgG	imunoglobulina da classe G
IgM	imunoglobulina da classe M
LB	<i>Luria-Bertani</i> .
LCR	<i>long control region</i> ou região longa de controle
LLETZ	<i>large loop excision of the transformation zone</i> ou excisão de alça larga da zona de transformação.
LSIL	<i>low grade squamous intraepithelial lesion</i> ou lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
LS-PCR	<i>low stringency polymerase chain reaction</i> ou reação de polimerização em cadeia de baixa estringência.
NAb	<i>Neutralizing antibodies</i> ou anticorpos neutralizantes

NaCl	cloreto de sódio
NAR	<i>Normalized Absorbance Ratio</i> ou Razão de Absorbância Normalizada
OPD	ortofenilenodiamina
OR	<i>Odds Ratio</i> ou Razão de Chances
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> ou eletroforese em gel de poliacrilamida.
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ou salina fosfato tamponada
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ou reação de polimerização em cadeia
RIA	<i>radioimmune assay</i> ou radioimunoensaio.
RIPA	<i>radioimmune precipitation assay</i> ou ensaio de radio-imuno precipitação.
ROC	<i>receiver operating characteristic curve</i> ou curva característica do receptor/operador.
RR	risco relativo.
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i> ou dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i> ou eletrofororese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio.
SEAP	<i>secretable alkaline phosphatase</i> ou fosfatase alcalina secretável.

SFB	soro fetal bovino
SIL	<i>squamous intraepithelial lesion</i> ou lesão intraepitelial escamosa
SV40	<i>simian vírus 40</i> ou vírus símio 40.
TE	tampão Tris/EDTA
URL	unidade relativa de luminescência.
VLP	<i>vírus-like particles</i> - partículas semelhantes a vírus.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	01
1.1	CARCINOMA DE COLO DE ÚTERO E HPV	01
1.2	FATORES DE RISCO DO CARCINOMA DE COLO DE ÚTERO	03
1.3	IMUNIDADE HUMORAL AO HPV	07
2	OBJETIVOS	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	ESTUDO PROSPECTIVO LUDWIG MCGILL	17
3.2	SELEÇÃO DE SOROS PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA O HPV-16	18
3.3	EXAME CITOLÓGICO DOS ESFREGAÇOS DE COLO UTERINO	19
3.4	EXTRAÇÃO DO DNA DE HPV	20
3.5	DETECÇÃO E TIPAGEM DO DNA DE HPV	21
3.6	DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL DE HPV NAS AMOSTRAS	21
3.7	ELISA PARA A DETECÇÃO DE IGG CONTRA VLP DE HPV-16	22
3.7.1	Soros Controle BR	23
3.7.2	Etapa de Adsorção do Antígeno à Microplaca	24
3.7.3	Etapa de Adição dos Soros Pesquisados	25
3.7.4	Etapa de Adição do Conjugado	26
3.7.5	Etapa de Adição do Substrato	26
3.7.6	Controle da Variação dos Resultados na Reação Imunoenzimática (ELISA)	27
3.7.7	Definição da Positividade Sorológica	28

3.8	ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO DE PSEUDOVÍRIONS DE HPV-16	30
3.8.1	Plasmídios e Linhagens Celulares	30
3.8.2	Geração dos Pseudovírions de HPV-16 e BPV-1	32
3.8.3	Ensaio de Neutralização de Pseudovírions de HPV-16	35
3.8.4	Detecção Quimioluminescente da Fosfatase Alcalina Secretada nos Ensaios de Neutralização de Pseudovírions de HPV-16	36
3.8.5	Definição dos Controles do Ensaio de Neutralização de Pseudovírions de HPV-16	37
3.8.6	Definição da Positividade Sorológica	39
3.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	55
3.9.1	Associação entre Positividade Sorológica e Risco de Infecção pelo HPV	55
3.9.2	Avaliação da Validade e Confiabilidade das Medidas de Reatividade Sorológica	56
3.9.3	Avaliação da Carga Viral de HPV-16	58
4	RESULTADOS	60
5	DISCUSSÃO	83
6	CONCLUSÕES	93
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARCINOMA DE COLO DE ÚTERO E HPV

O carcinoma de colo de útero foi comprovadamente associado a um determinante de risco principal, que é a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) (FRANCO et al. 1999b).

A taxa de prevalência do DNA de HPV determinada em uma grande amostragem de tumores de colo de útero testados por meio de PCR foi de 99,7 por cento (WALBOOMERS et al. 1999). Assim, considera-se a ocorrência do carcinoma de colo de útero sem o envolvimento de tipos de HPV específicos como excepcional.

O carcinoma de colo de útero apresenta-se como a segunda neoplasia mais importante dentre a população feminina mundial e como a terceira neoplasia feminina mais importante dentre a população brasileira. Esta neoplasia é responsável por cerca de 466.800 novos casos/ano e 233.400 mortes a cada ano em todo mundo (BOSCH e SANJOSÉ 2003), dentre os quais estima-se que cerca de 20.690 novos casos/ano e 10.138 mortes ocorrerão no Brasil no ano corrente de 2005 (Ministério da Saúde 2004).

Os papilomavírus são vírus hospedeiro-específicos, pertencentes à Família *Papillomaviridae*, gênero *Papillomavirus* (VAN REGENMORTEL et al. 1999), que se encontram disseminados pelos epitélios dos mais diversos

gêneros e são responsáveis pela formação de lesões verrucosas ou chatas sem provocar inflamação local (FRAZER 1996). Estas lesões podem, eventualmente, evoluir para neoplasias benignas ou malignas. Um dos eventos necessários para a progressão das lesões verrucosas precursoras para neoplasias é a integração do genoma viral ao genoma da célula hospedeira (DURST et al. 1985), que ocorre muito cedo no desenvolvimento do carcinoma cervical (LEHN et al. 1988).

O HPV é um vírus de diâmetro compreendido entre 55 e 60 nm, que se apresenta sob a forma de partículas icosaédricas não envelopadas (ZHOU e FRAZER 1996). O genoma deste vírus compõe-se por DNA dupla fita circular, constituído por aproximadamente 7.200 a 8.000 pares de bases (ZUR HAUSEN 1996b; VILLA 1997), e divide-se em três segmentos de tamanhos desiguais: uma região não codificadora denominada de região longa de controle ou LCR, uma região precoce e uma região tardia.

A LCR é responsável pelo controle da replicação/transcrição do genoma viral e constitui somente 10% do genoma (HOWLEY 1996). A região precoce é caracterizada por seis genes (E6, E7, E1, E2, E4 e E5), cujas proteínas são responsáveis por pela persistência do genoma viral, replicação do DNA viral e ativação do ciclo produtivo, dentre outras, e é representada por cerca de 50% do genoma. A região tardia caracteriza-se por dois genes (L1 e L2), cujas proteínas estruturais são responsáveis pela formação do capsídio viral, e é constituída por cerca de 40% do genoma viral (IARC 1995; ZUR HAUSEN 1996b).

A detecção recorrente de alguns tipos de HPV em lesões precursoras ou neoplásicas, dentre os quais os tipos 16 e 18 são os mais prevalentes, permitiu que os mais de 100 tipos de HPV fossem segmentados em duas classes. Os HPV de alto risco oncogênico são preferencialmente detectados em lesões malignas enquanto que os HPV de baixo risco, dos quais os tipos 6 e 11 são os mais prevalentes, são preferencialmente encontrados em verrugas genitais ou em *condyloma acuminatum*, respectivamente (LÖRINCZ et al. 1992).

Logo, a infecção do trato ano-genital por tipos de HPV de alto risco oncogênico predispõe os indivíduos afetados a um risco mais elevado de desenvolver lesões escamosas intraepiteliais de alto grau (VILLA 1997) e, potencialmente, aumenta o risco desses pacientes de virem a desenvolver o carcinoma do colo de útero.

1.2 FATORES DE RISCO DO CARCINOMA DE COLO DE ÚTERO

Os fatores de risco para o carcinoma do colo de útero podem ser divididos em dois grandes grupos: os fatores de risco intrínsecos à neoplasia *per se* e os fatores de risco intrínsecos ao agente etiológico da neoplasia, o HPV, ou aos indivíduos infectados.

O carcinoma de colo de útero comporta-se epidemiologicamente como uma doença sexualmente transmitida (DST) (ZUR HAUSEN 1996a), pois o seu surgimento é fortemente influenciado pelas medidas de atividade

sexual, seja das próprias mulheres ou de seus parceiros (BRINTON et al. 1989; BURK et al. 1996; CASTELLSAGUE et al. 1997; VILLA 1997).

Os fatores de risco intrínsecos ao desenvolvimento do carcinoma de colo de útero compreendem a baixa condição sócio-econômica, os maus hábitos de higiene (Ministério da Saúde 2004), o tabagismo (ROUSSEAU et al. 2000), a idade precoce da mulher no primeiro coito, a elevada paridade da paciente, o elevado número de parceiros sexuais durante toda a vida da paciente (MUÑOZ e BOSCH 1996) e o uso prolongado de anticoncepcionais (YLITALO et al. 1999).

As infecções por HPV, até mesmo aquelas causadas por tipos virais oncogênicos, são tão comuns na população em geral que o simples fato da infecção *per se* não pode mais ser considerado como um fator determinante na carcinogênese cervical (SCHIFFMAN e KJAER 2003). Como somente uma pequena porcentagem da população total de mulheres infectadas por tipos oncogênicos de HPV efetivamente chega a desenvolver o carcinoma de colo de útero (IARC 1995), o passo crítico para a maioria das mulheres infectadas parece ser o posterior desenvolvimento de lesões pré-malignas, como uma resultante da infecção viral (SCHIFFMAN e KJAER 2003).

Em virtude disso, os fatores de risco inerentes ao HPV ou aos indivíduos infectados tornam-se muito importantes na tentativa de desvendar as razões que levam ao desenvolvimento do carcinoma de colo de útero. O estudo prospectivo Ludwig/McGill sobre os fatores de risco que levam à detecção de infecções pelo HPV e ao desenvolvimento de lesões precursoras do colo do útero contribuiu para o conhecimento em diversas

vertentes. Além da infecção por tipos de HPV de alto risco oncogênico, também a presença de variantes moleculares de determinados tipos de HPV (VILLA et al. 2000), em especial HPV-16 e HPV-18, de elevadas cargas virais (SCHLECHT et al. 2003), de integração do DNA viral ao genoma celular (KLAES et al. 1999), de polimorfismos no códon 72 da proteína p53 (MAKNI et al. 2000) ou nas moléculas de HLA de Classes I e II (MACIAG et al. 2000 e MACIAG et al. 2002) poderiam favorecer a replicação do vírus em larga escala e aumentar a probabilidade do desenvolvimento de lesões novas ou recorrentes e da progressão de lesões já estabelecidas (IARC 1995).

A taxa de aquisição de novas infecções causadas por HPV em mulheres negativas para a detecção de DNA viral e citologicamente normais apresenta-se dentro de um intervalo de 1-1,3% por mês (FRANCO et al. 1999b; SYRJANEN et al. 2004). Por outro lado, a taxa de aquisição de um resultado citológico anormal dentro de um grupo de mulheres citologicamente normais que apresentem a detecção de DNA viral de HPV de alto risco, pode atingir 3,8% ao mês. Estas mulheres apresentam um risco estatisticamente significativo de, aproximadamente, sete vezes, para desenvolverem resultados citológicos anormais ao longo do seguimento do estudo (SYRJANEN et al. 2004).

As infecções causadas por tipos de HPV de baixo risco oncogênico apresentam, em geral, uma taxa de eliminação maior em um menor período de tempo (12,2% em 170 dias de seguimento) do que as infecções causadas

por tipos de HPV de alto risco oncogênico (9,5% em 226 dias de seguimento) (FRANCO et al. 1999b; BROWN et al. 2005).

Em uma coorte de universitárias canadenses, a taxa de infecção cumulativa por HPV-16 foi calculada em 12%, ao longo de 24 meses de seguimento. Essas infecções apresentavam também a maior persistência (18,3 meses) e a maior frequência de aquisição (5,2% em cada 1000 mulheres/mês) (RICHARDSON et al. 2003).

A persistência da detecção do HPV após o tratamento das lesões precursoras por LLETZ (*large loop excision of the transformation zone*) parece ser favorecida pelo fumo, idades superiores a 35 anos, independentemente da positividade das margens cirúrgicas e a margens cirúrgicas positivas em mulheres mais jovens do que 35 anos (SARIAN et al. 2004). A persistência da detecção viral após o tratamento de carcinoma cervical por radioterapia está em geral associada a um pior prognóstico para sobrevivência livre de doença local e para sobrevivência como um todo (NAGAI et al. 2004).

A detecção positiva de HPV-16 com elevada carga viral relaciona-se com o risco elevado (cerca de cinco vezes) de que as portadoras viessem a desenvolver uma lesão precursora de alto grau (RAJEEVAN et al. 2005). A elevada carga viral de HPV-16, especificamente, foi responsável pela elevação do risco de que as portadoras viessem a desenvolver um carcinoma *in situ* de cerca de trinta e sete vezes, quando comparada com os riscos calculados para as cargas virais elevadas de HPV-31 (3,2) e de HPV 18/45 (2,6) (MOBERG et al. 2005).

O estudo intensivo dos mecanismos associados às respostas imunológicas disparadas pela infecção pelo HPV tem por objetivos principais: desvendar as causas que influenciam a demora na criação de respostas imunológicas efetivas ou a geração de padrões menos eficientes de respostas celulares e determinar perfis imunológicos de maior suscetibilidade à infecção viral.

1.3 IMUNIDADE HUMORAL AO HPV

A detecção sorológica da infecção pelo HPV ainda não se tornou uma prática de rotina na maioria dos laboratórios clínicos. Tal realidade deve-se ao fato de que os primeiros ensaios sorológicos, por terem sido desenvolvidos com proteínas do capsídio viral desnaturadas ou com proteínas precoces virais regulatórias, não apresentaram sensibilidade e especificidade suficientes para garantir resultados absolutamente confiáveis (SCHILLER e RODEN, 1996).

O desenvolvimento de ensaios sorológicos que utilizam capsídios virais íntegros de vários tipos de HPV como antígeno, entretanto, permitiu que os pesquisadores tivessem acesso a outra ferramenta metodológica capaz de determinar a relevância das infecções por HPV na etiologia de neoplasias ano-genitais (GALLOWAY 1996). Além disso, estes mesmos ensaios têm demonstrado a utilidade de terem-se anticorpos séricos anti-vírions como marcadores de infecção de HPV (SCHILLER e RODEN, 1996).

A importância do desenvolvimento das metodologias de investigação sorológica reside no fato de que a ausência de material genômico amplificável em amostras de esfregaços cervicais coletadas de maneira inadequada ou a presença de uma carga viral suficientemente baixa para escapar a sensibilidade dos métodos baseados em PCR em amostras de esfregaços cervicais pode limitar o poder de detecção das metodologias de biologia molecular (GALLOWAY, 1996).

O advento dos ensaios sorológicos serem capazes de detectar a disseminação da infecção por HPV por meio de simples amostras de sangue, teria implicações muito importantes em termos de saúde pública, justificando o empenho em desenvolver uma metodologia de detecção sorológica padronizada e confiável (SCHILLER e RODEN, 1996).

A abordagem que proporcionou um novo impulso aos estudos de imunologia humoral das infecções por HPV e, em especial, ao desenvolvimento dos ensaios sorológicos, foi a produção dos capsídeos virais vazios ou *virus-like particles* (VLP) de HPV-16 em células eucarióticas (FRAZER, 1996; GALLOWAY, 1996; SCHILLER e RODEN, 1996). O primeiro sistema desenvolvido para a elevada expressão das VLP baseava-se na infecção de células eucarióticas de insetos por baculovírus recombinantes para os genes tardios L1/L2 de HPV-16 (KIRNBAUER *et al.*, 1992; 1993; 1994). Atualmente, estão disponíveis outros sistemas de expressão para VLP de diversos tipos de HPV, tais como bactérias (LI *et al.*, 1997), leveduras (SASAGAWA *et al.* 1995; LOWE *et al.*, 1997) e vaccínia em células COS-7 (UNCKELL *et al.* 1997).

As VLP apresentam uma conformação semelhante aos vírions selvagens infecciosos, mas não possuem o material genético e potencialmente oncogênico responsável pelo estabelecimento da infecção viral. Esse fato permite que as mesmas sejam utilizadas tanto como antígenos em imunoenaios quanto como antígenos indutores de respostas imunológicas em protocolos de imunização (SCHILLER e RODEN, 1996).

A primeira metodologia utilizando VLP para detecção de anticorpos séricos contra diversos tipos de HPV descrita foi um ensaio do tipo ELISA direto (KIRNBAUER *et al.*, 1994). Entretanto, a busca por desenvolver metodologias capazes de detectar esses anticorpos de maneira mais sensível e específica tem se intensificado ao longo dos anos.

Os ensaios de radioimunoprecipitação (RIPA) e de ELISA de captura, embora apresentem elevada sensibilidade e especificidade, são de complexa execução e não se aplicam ao teste rotineiro de um elevado número de amostras (MESCHÉDE *et al.*, 1998).

A busca de metodologias que detectassem os anticorpos séricos contra HPV de maneira mais sensível do que os ensaios do tipo ELISA direto originaram o desenvolvimento de radioimunoensaios (RIA) (PALKER *et al.* 2001) e de ensaios luminescentes do tipo multiplex, ou seja, capazes de detectar anticorpos gerados contra tipos diferentes de HPV presentes na mesma amostra sérica (OPALKA *et al.* 2003).

A detecção sorológica de diversos tipos de HPV por meio de ensaios imunológicos que utilizam VLP tem demonstrado uma elevada concordância

com a detecção concorrente do DNA viral na cérvix uterina (DILLNER, 1999).

A soropositividade em um ELISA-VLP parece refletir a exposição cumulativa relativa aos HPV, especialmente em populações geográficas que apresentam um elevado risco de desenvolver câncer cervical, de maneira mais eficiente do que a própria detecção do DNA deste vírus (NONNENMACHER *et al.*, 1996, OLSEN *et al.*, 1996, STRICKLER *et al.*, 1999).

Os estudos de WIDEROFF *et al.* (1995) demonstraram que a detecção persistente do DNA de HPV-16 confere uma elevação brutal da taxa de soropositividade para anticorpos contra HPV-16. SASAGAWA *et al.* (1998) relataram que a soropositividade contra HPV-16 parece refletir infecções virais persistentes que podem aumentar o risco para progressão maligna de lesões cervicais, sugerindo que essas infecções são cruciais para o desenvolvimento de respostas humorais efetivas contra o HPV.

Segundo DE GRUIJL *et al.* (1997), os anticorpos específicos contra VLP de HPV-16 não seriam responsáveis pela eliminação das lesões induzidas pelo vírus, mas poderiam ser indicativos de um risco aumentado para o câncer cervical em pacientes com infecções persistentes por HPV-16, funcionando mais como marcadores de progressão do que como agentes eliminadores de infecção.

CARTER *et al.* (1996) avaliaram estudantes universitárias no início de sua vida sexual durante um período de 3 a 4 anos em um estudo de seguimento e concluíram que mulheres positivas para o DNA de qualquer

HPV têm cerca de 12 vezes mais probabilidade de soroconverter do que as mulheres negativas para o DNA destes vírus, e que esta soroconversão ocorre dentro de um período médio de 8,3 meses após a detecção do DNA viral. Concluíram também que a resposta humoral, apesar de demorar mais tempo para surgir, mantém-se por muito mais tempo no indivíduo do que a detecção do DNA viral ($\cong$ 3 anos contra $\cong$ 14 meses). Além disso, todas as mulheres que soroconverteram tinham cerca de 6 vezes mais probabilidade de desenvolver SIL associadas ao HPV-16 do que as mulheres que não soroconverteram.

Em uma publicação mais recente, CARTER et al. (2000) descreveram que a detecção transiente do DNA viral foi constantemente associada com uma falha em soroconverter, embora algumas mulheres que portavam detecção persistente do DNA viral também nunca tenham soroconvertido. Foram detectadas também diferenças tipo-específicas dentre as respostas humorais: a soroconversão de mulheres infectadas com HPV-16 ocorreu mais freqüentemente entre 6 e 12 meses a partir da detecção do DNA, ao passo que a soroconversão para o HPV-6 coincidiu com a detecção do DNA viral. As respostas humorais contra HPV-16 e -18 foram significativamente mais persistentes durante o seguimento destas mulheres do que as respostas humorais contra HPV-6.

A presença de soropositividade no momento da admissão ao estudo Ludwig-McGill foi mais fortemente associada com infecções persistentes pelo HPV durante o primeiro ano de seguimento, sendo também capaz de prever um risco cumulativo maior para a infecção por tipos de HPV de alto

risco. Além disso, a soropositividade no momento de admissão ao estudo também conferiu um maior risco do desenvolvimento de quaisquer SIL, prevalentes ou incidentes, aliado a um risco mais elevado para o desenvolvimento específico de HSIL do que qualquer SIL, mesmo após o ajuste das análises para presença de DNA de HPV e idade à admissão (CANDEIAS 1998; CANDEIAS et al. 1999).

NAKAGAWA et al. (2002) sugeriram a presença de memória imunológica em um pequeno grupo de pacientes analisadas tanto para respostas humorais (detecção de anticorpos contra VLP de HPV-16) quanto para respostas celulares (respostas de linfócitos T citotóxicos). Estes autores verificaram que as pacientes que apresentaram dois episódios de infecção pelo DNA de HPV-16 separados por algumas visitas negativas tiveram uma eliminação do DNA viral muito mais rápida do que as que apresentaram apenas um episódio de infecção. Além disso, estas mesmas pacientes apresentaram um rápido surgimento tanto de anticorpos contra VLP de HPV-16 quanto de uma resposta de linfócitos T citotóxicos no momento do segundo episódio de infecção pelo HPV. Entretanto, os autores também discutem que os baixos níveis de anticorpos contra VLP de HPV-16 podem não ser suficientes para prevenir a re-infecção com o HPV-16 ou o ressurgimento deste vírus, mas desempenhem uma função de controle destas novas infecções.

HO et al. (2002), por outro lado, demonstraram que anticorpos persistentes contra VLP de HPV-16 estavam associados com um risco reduzido para infecções subseqüentes com este tipo viral e com tipos virais

filogeneticamente relacionados (HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-52 e HPV-58).

Ao longo dos últimos anos, uma questão tem intrigado vários pesquisadores: se alguma fração, dentre as imunoglobulinas G (IgG) totais detectadas por meio de ELISA e geradas contra VLP de HPV-16, apresenta a capacidade de impedir que as partículas de HPV-16 penetrem nas células do hospedeiro. E, em caso afirmativo, qual seria o título dos anticorpos neutralizantes presentes?

Sabe-se que anticorpos gerados contra VLP de HPV-16 apresentam efeitos neutralizantes e são capazes de proteger as células do hospedeiro de infecção pelo HPV (HO et al. 2002). De maneira geral, estes anticorpos são produzidos após um procedimento de imunização dos indivíduos com VLP/L1L2 específicas de vários tipos de HPV (MURAKAMI et al. 1999; LOWE et al. 1997), DNA viral (MATSUMOTO et al. 2000) ou VLP/L1L2E7 quiméricas (JOCHMUS et al. 1999).

TOBERY et al. (2003) demonstraram que a via de imunização de L1 de HPV-16 em macacos *rhesus* altera drasticamente a natureza da resposta imune contra L1 de HPV-16 que é deflagrada. A imunização de macacos com a proteína L1 de HPV-16 originou uma resposta humoral potente com anticorpos fortemente neutralizantes e uma resposta Th2 fortemente específica contra L1 de HPV-16, de acordo com a medida da produção de IL-4 por células T CD4+. A imunização de macacos com DNA plasmidial ou com um vetor adenoviral expressando o gene de L1 de HPV-16 induziu uma resposta Th1 forte, de acordo com a dosagem da produção de IFN-gamma

pelas células T CD4+ ou T CD8+, além de uma resposta humoral igualmente forte, porém baseada em anticorpos não neutralizantes.

BOUSARGHIN et al. (2002) relataram a detecção de anticorpos neutralizantes tanto nos soros provenientes de pacientes imunizadas com VLP de HPV-16 quanto nos soros de pacientes não imunizadas. PASTRANA et al. (2001), por sua vez, relataram que anticorpos neutralizantes presentes nos soros de pacientes imunizadas com VLP de HPV-16 são capazes de neutralizar variantes moleculares divergentes de HPV-16. Finalmente, KAWANA et al. (2002) demonstraram que a presença de anticorpos neutralizantes estava associada a uma elevada taxa de regressão das lesões de colo uterino e parece retardar a progressão destas lesões.

Vários são os protocolos descritos para detectar anticorpos neutralizantes em amostras séricas, mas todos eles fundamentam-se em ensaios de neutralização de pseudovirions de HPV (YEAGER et al. 1999; PASTRANA et al. 2001; BOUSARGHIN et al. 2002, KAWANA et al. 2002; RODEN et al. 1996a). O protocolo de geração de pseudovirions utilizado neste estudo foi descrito por BUCK et al. (2004) e o ensaio de neutralização de pseudovirions de HPV-16 foi descrito por PASTRANA et al. (2004).

Pouco tem sido descrito, entretanto, a respeito do papel dos anticorpos neutralizantes contra o HPV-16 gerados em mulheres não imunizadas, seguidas num contexto de história natural de infecção viral. Em virtude disso, optamos por avaliar a presença de anticorpos neutralizantes nos soros proveniente das pacientes acompanhadas pelo estudo prospectivo Ludwig/McGill, investigando um eventual papel da presença destes

anticorpos na ocorrência de diversos eventos relacionados às infecções pelo HPV-16, tais como persistência, aquisição de novas infecções, eliminação de infecções prevalentes, carga viral e prevalência cumulativa do HPV-16.

Fundação Antonio Prudente
Ana Maria - Médica / Jure-Consultora
Coordenadora Pós-graduação

2 OBJETIVOS

1. Avaliar a presença de anticorpos neutralizantes desenvolvidos contra o HPV-16 em amostras séricas de mulheres não imunizadas e correlacionar os dados obtidos com a detecção do DNA de HPV-16 por meio de PCR em amostras pareadas de esfregaços cervicais.
2. Determinar se há correlação entre a detecção de anticorpos da classe IgG por meio de ELISA-VLP para HPV-16 e a detecção de anticorpos neutralizantes por meio do ensaio de neutralização de pseudovirions de HPV-16, realizada nas mesmas amostras séricas.
3. Comparar os resultados sorológicos obtidos por meio de ELISA-VLP e do ensaio de neutralização de pseudovirions de HPV-16 com os resultados de história clínica das pacientes, coletados ao longo do primeiro ano de seguimento do estudo prospectivo Ludwig/McGill: persistência/transiência e aquisição/eliminação de infecções causadas pelo HPV-16, além da detecção de carga viral de HPV.
4. Avaliar a estabilidade dos anticorpos neutralizantes ao longo do tempo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ESTUDO PROSPECTIVO LUDWIG MC/GILL

Os espécimes biológicos (esfregaços de colo uterino e soros) utilizados neste estudo foram coletados de mulheres assintomáticas para a infecção pelo HPV que concordaram em participar do estudo prospectivo Ludwig/McGill. Este estudo, de longa duração, refere-se à história natural da infecção pelo HPV e da neoplasia de colo uterino e aos fatores determinantes da persistência destes vírus no colo do útero. A coordenação deste estudo tem sido realizada pela Dra. Luisa Lina Villa, do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, filial São Paulo, e pelo Dr. Eduardo L. Franco, da Universidade McGill, Montreal/Quebec, Canadá. Além disso, vale salientar que o estudo Ludwig/McGill foi aprovado por todos os comitês de ética dos hospitais e instituições envolvidos. A população amostral deste estudo consiste de mulheres pertencentes a uma população de baixa renda da cidade de São Paulo.

Os critérios de inclusão e exclusão de pacientes, bem como todos os detalhes do estudo prospectivo Ludwig/McGill foram previamente publicados (FRANCO et al. 1999a). Brevemente, 2529 mulheres atendidas pelas clínicas de ginecologia e planejamento familiar do Hospital Municipal de Vila Nova Cachoeirinha, zona norte da cidade de São Paulo, foram admitidas em um estudo constante de múltiplas etapas. À admissão, as mulheres

arroladas respondiam a um questionário padrão, aplicado por entrevistadores experientes, que visava avaliar hábitos de higiene, atividade sexual e condições sócio-demográficas das pacientes.

Em seguida, estas eram encaminhadas para a coleta de amostras de esfregaços de colo uterino e de sangue. Os espécimes cervicais seriam posteriormente submetidos aos exames citológicos de Papanicolaou e de detecção, tipagem e quantificação do DNA de HPV, ao passo que os espécimes séricos seriam submetidos aos testes imunológicos para detecção de imunoglobulinas das classes G e M contra capsídios de HPV-16.

Estes mesmos procedimentos foram repetidos com intervalos de quatro meses durante o primeiro ano de seguimento e, posteriormente, com intervalos de seis meses para os esfregaços de colo de útero e de doze meses para as amostras séricas, até o encerramento do estudo, que deve ocorrer no final de 2005.

3.2 SELEÇÃO DE SOROS PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA O HPV-16

A seleção de soros para a detecção de anticorpos neutralizantes baseou-se no processo de amostragem conhecido como caso-controle aninhado (*nested case-control sampling*).

A população amostral deste estudo compreendeu 506 mulheres, pertencentes ao estudo Ludwig/McGill, dentre as quais os controles

apresentavam resultados consistentemente negativos para a detecção de DNA de HPV ao longo do primeiro ano de seguimento do estudo (admissão, 4 meses, 8 meses e 12 meses) e os casos apresentavam um ou mais resultados positivos de detecção de DNA de HPV-16 durante o mesmo período.

Os resultados preliminares aqui apresentados correspondem à detecção de anticorpos neutralizantes em uma parcela desta população amostral, composta por amostras séricas provenientes de 150 mulheres e coletadas à admissão ao estudo. Cerca de 100 amostras séricas pareadas, coletadas à admissão e após um ano de seguimento do estudo, foram também testadas para averiguar a estabilidade dos anticorpos neutralizantes ao longo do tempo.

3.3 EXAME CITOLÓGICO DOS ESFREGAÇOS DE COLO UTERINO

As lâminas de esfregaços de colo uterino provenientes de cada coleta, coradas pelo método de Papanicolaou, foram analisadas por um citotécnico treinado no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer.

A classificação das lâminas empregou o sistema de Bethesda (HERBST 1992) de diagnóstico de citologia de colo uterino, instituído em 1989 e revisado em 2001 (HENRY 2003), que organizou o sistema de classificação citopatológica para a leitura dos esfregaços nas seguintes categorias:

- Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado (ASCUS) (do inglês *atypical squamous cells of undetermined significance*).
- Lesão Intraepitelial Escamosa (SIL) (do inglês *squamous intraepithelial lesion*).
- Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL) (do inglês *low-grade squamous intraepithelial lesion*).
- Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL) (do inglês *high-grade squamous intraepithelial lesion*).

3.4 EXTRAÇÃO DO DNA DE HPV

As células oriundas dos esfregaços da região genital foram colhidas com o auxílio de uma escova (Cytobrush) e transferidas para tubos contendo o tampão Tris/EDTA 10 mM/1mM (Tampão de Eluição ou TE). A extração do DNA de HPV das amostras foi efetuada por tratamento com 1mg/ml de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 20mg/ml de proteinase K, seguido de incubação em banho-maria a 37° C overnight. Findo este período, efetuou-se a inativação da proteinase K por ebulição do material a 95 ° C durante 10 minutos. A purificação do DNA das amostras foi realizada por meio do uso do kit Glass Max DNA Isolation (GIBCO BRL), segundo instruções do fabricante.

3.5 DETECÇÃO E TIPAGEM DO DNA DE HPV

A detecção do DNA de HPV nas amostras foi realizada por meio da reação de PCR utilizando-se os iniciadores genéricos MY 09/11, que amplificam uma região muito conservada de 450 pb do gene L1 de HPV (BAUER et al. 1992).

A tipagem do HPV foi feita por meio da reação de hibridização em pontos (*dot-blot*) com sondas oligoméricas específicas para os seguintes tipos de HPV: 06, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 66, 68, 70, 72 e 73. Além disso, avaliou-se também a presença de alguns HPV isolados de espécimes clínicos que ainda não foram formalmente determinados, tais como PAP 155, PAP 291 e W13B (BAUER et al. 1992; HILDESHEIM et al. 1993).

3.6 DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL DE HPV NAS AMOSTRAS

A determinação da carga viral de HPV nos espécimes cervicais foi efetuada por meio da metodologia de PCR de Baixa Estringência ou Low-Stringency PCR (LS-PCR), conforme descrita por CABALLERO et al. (1995) e originou resultados notados em número de cópias virais/célula.

Esta metodologia baseia-se em uma reação de PCR de baixa estringência, que utiliza um par de iniciadores degenerados em três posições (GP5+, GP6+), evidenciada por um gel de poliacrilamida (PAGE).

O princípio deste método é a competição existente entre duas bandas inespecíficas geradas pela reação de PCR de baixa estrringência, uma amplificada do genoma viral (150 pb) e a outra amplificada do genoma humano (192 pb). Em seguida, realiza-se a densitometria dos produtos amplificados e os valores obtidos são colocados em um programa estatístico com o objetivo de calcular o número de cópias virais/célula. O logaritmo da razão entre as duas bandas (DNA viral/DNA humano) é diretamente proporcional ao logaritmo da quantidade de DNA de HPV do espécime cervical. A quantificação é obtida pela interpolação linear usando uma curva padrão construída com o resultado de misturas-controle (DNA viral/DNA humano) contendo diferentes quantidades de DNA de HPV.

A variável carga viral de HPV-16 foi arbitrariamente dicotomizada em alta (>100 cópias/célula) e baixa (< 100 cópias/célula) carga viral.

3.7 ELISA PARA A DETECÇÃO DE IgG CONTRA VLP DE HPV-16

A metodologia de ELISA utilizada neste estudo foi adaptada daquela previamente descrita por KIRNBAUER et al. (1994) e WIDEROFF et al. (1995). A Figura 1A ilustra, esquematicamente, a reação de ELISA-VLP para HPV-16 e a Figura 1B, ilustra os componentes de uma microplaca ELISA-VLP.

A obtenção de VLP deu-se por meio da expressão dos genes tardios L1 e L2 do capsídio de HPV-16 recombinantes em células de inseto

(KIRNBAUER et al. 1992; KIRNBAUER et al. 1993) e do gene tardio L1 de HPV-16 recombinante em leveduras (LOWE et al. 1997).

3.7.1 Soros Controle (BR)

A existência de outras formas de transmissão do HPV, além da transmissão via atividade sexual, não permite que se elimine a probabilidade de que, virtualmente, todo soro apresente baixos níveis de anticorpos contra o HPV. Até mesmo nos soros provenientes de populações normalmente utilizadas como controles negativos para a infecção por esse agente, devido a sua provável ausência de atividade sexual, tais como freiras, virgens ou recém-nascidos, a presença de anticorpos gerados contra o HPV não poderia ser desconsiderada.

Entretanto, a necessidade de estabelecimento de soros cujos intervalos de variação de valores de absorbância bruta resultantes fossem conhecidos fez-se presente no momento da padronização do ELISA-VLP para HPV-16. Estes soros têm por objetivo atuar como soros de controle das variações intra e inter ensaios dessa metodologia.

Além disso, esses soros poderiam atuar como fatores de normalização dos resultados obtidos, pois, ao menos em teoria, eles demonstrariam o *background* populacional quanto ao título de anticorpos anti-HPV presentes naturalmente na população. Esses anticorpos anti-HPV populacionais adviriam de cicatrizes sorológicas obtidas após contatos prévios dos indivíduos com o agente e não estariam, necessariamente, sujeitos à presença concomitante do DNA viral.

Para tanto, um *pool* de soros proveniente de mulheres doadoras de sangue do Banco de Sangue do Hospital A.C. Camargo, São Paulo, foi formado. Todos os soros componentes deste *pool* resultaram negativos para os testes efetuados no momento da doação de sangue (Chagas, Sífilis, HIV, Hepatites B e C, ALT e anti HTLV-1) e originaram um volume final de 4 litros de soro.

Um dos principais cuidados tomados foi o de que o *pool* de soros deveria apresentar um volume suficiente para a sua utilização como controle até o final do estudo. Assim, as eventuais variações que ocorreriam caso houvesse o esgotamento do estoque em uso e fosse necessária a substituição desse *pool* por um novo lote de soro controle seriam evitadas. As alíquotas deste soro, designado ***pool BR***, estão armazenadas em freezer a uma temperatura de -20°C .

3.7.2 Etapa de Adsorção do Antígeno à Microplaca

A solução de VLP de HPV-16 purificadas foi diluída em PBS 150 mM, pH 7,3, até alcançar uma concentração final de $0,01\ \mu\text{g/ml}$, para que um volume de $50\ \mu\text{l}$ (50 ng de proteína por poço) desta diluição fosse adicionado às cavidades de uma microplaca de 96 poços da marca Immulon II (DYNATECH, Chantilly, VA, USA). A seguir, a microplaca foi incubada em câmara úmida por 2 horas a 37°C ou *overnight* a 4°C . Após este período, a placa foi lavada por três vezes, durante três minutos a cada vez, em um lavador automático de microplacas (BIORAD, USA) com PBS 150 mM, pH7,3.

3.7.3 Etapa de Adição dos Soros Pesquisados

Um volume de 50 μ l dos soros dos pacientes diluídos a 1:10 e a 1:50 em “PBS enriquecido”, constituído por 0,5% de leite desnatado diluído em PBS 150 mM, pH7,3, acrescido de 0,1% de soro fetal bovino [SFB - GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD, USA] e 1% de albumina bovina sérica fração V [BSA – INLAB, SP, BR], foram adicionados às cavidades da microplaca logo após a última lavagem. Após incubação em câmara úmida a 37°C, durante 45 minutos, a microplaca foi lavada cinco vezes, durante três minutos a cada vez, em um lavador automático de microplacas, com PBS 150 mM, pH7,3.

A diluição das amostras séricas em teste em PBS enriquecido tem por objetivo bloquear reações inespecíficas entre os componentes do soro e as VLP adsorvidas às microplacas ou entre estes mesmos componentes e o próprio poliestireno da microplaca.

As soluções de PBS enriquecido utilizadas nestes ensaios foram feitas no dia de cada reação e foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos antes do uso para evitar a presença de grumos de leite ou de outros compostos não totalmente dissolvidos.

Todos os soros em teste foram testados em duplicata, e a média aritmética da absorbância apresentada por cada soro foi utilizada no cálculo dos pontos de corte ou *cut-off* e dos índices de absorbância normalizada (vide adiante) e na análise estatística. Utilizamos como controles da reação de ELISA seis canaletas *blank* (constituídos apenas por antígeno, anticorpo anti IgG conjugado com peroxidase ácida, OPD e H₂SO₄) e seis canaletas

em que o *pool* de soros (BR) foi adicionado. A média dos valores de absorbância obtidos para os soros BR foi também utilizada para o cálculo dos índices de absorbância normalizada.

3.7.4 Etapa de Adição do Conjugado

Foram adicionados às cavidades 50 µl de soro de cabra anti IgG humana conjugado com peroxidase (TAGO IMMUNOLOGICALS, USA), diluído a 1:10.000 em "PBS enriquecido". A microplaca foi incubada por uma hora, em câmara úmida, a 37°C e, posteriormente, lavada por 3 vezes, durante 3 minutos a cada vez, em um lavador automático de microplacas, com PBS 150 mM, pH7,3.

3.7.5 Etapa de Adição do Substrato

Foram adicionados à microplaca 100 µl da solução de substrato peróxido de hidrogênio ou H_2O_2 (10 µl), na presença do cromógeno orto-phenil-diamina ou OPD (10 mg) dissolvido em 25 ml de tampão citrato, sendo esta incubada à temperatura ambiente, no escuro. Após 20 minutos da adição do substrato, a reação enzimática foi bloqueada com ácido sulfúrico ou H_2SO_4 4N e a leitura espectrofotométrica foi realizada em um leitor de microplacas MR 4000 (DYNATECH, USA), no comprimento de onda de 490 nm.

3.7.6 Controle da Variação dos Resultados na Reação Imunoenzimática (ELISA)

A reatividade sorológica em ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA é medida diretamente pelos valores das absorvâncias colorimétricas correspondentes às amostras testadas, após a subtração dos valores correspondentes ao controle *blank*. Os valores de absorvância referentes ao *blank* indicam um "ruído" correspondente à atividade cromogênica basal dos reagentes, que deve ser subtraído dos valores de absorvância das amostras.

A variabilidade em cada microplaca de ELISA-VLP, por sua vez, foi evidenciada pela variação dos valores absolutos de absorvância dos soros controle BR, dentro de um intervalo pré-determinado, de um ensaio para o outro. Essa variância reflete, provavelmente, a grande variabilidade dentre os ensaios e as variações ocorridas em um mesmo ensaio, inerentes a um método sorológico tão sensível às variações experimentais quanto o teste de ELISA.

Para minimizar os efeitos dessa variabilidade inter e intra-ensaios, os valores absolutos das densidades ópticas (DO) das amostras de soros do estudo, testadas nos ensaios imunoenzimáticos para IgG, nas diluições de 1:10 e 1:50, foram convertidos nos valores de um índice, elaborado pelo Dr. Eduardo L. Franco: a razão de absorvância normalizada [normalized absorbance ratio (NAR)] segundo a fórmula abaixo descrita e, só então, foram analisados estatisticamente (FRANCO et al. 1999a).

NAR =

Média aritmética das absorvâncias das duplicatas do soro testado na diluição X

Média aritmética das absorvâncias das duplicatas do Pool de soros controle testado na diluição X e incluído na mesma placa onde o soro teste foi avaliado

A utilização desta normalização atenua o efeito das variações nas condições dos reagentes utilizados e na conduta de cada ELISA realizado, desde que estas sejam sistemáticas, ou seja, semelhantes em intensidade para um dado ensaio e afetando igualmente a todos os poços de uma mesma placa. Em teoria, estas variações estariam presentes tanto na reatividade das amostras em teste quanto na dos soros controles para a mesma placa e diluição.

3.7.7 Definição da Positividade Sorológica

A definição de um valor de *cut-off* para os dados sorológicos gerados por ELISA apresentou certa dificuldade, fundamentada no fato de que não há um consenso em literatura científica sobre o que deveria ser considerado como um critério ideal de definição de *cut-off* para soropositividade detectada por meio desta metodologia. A literatura pertinente descreve vários critérios, tais como: a definição *a priori* de valores de *cut-off* (NONNENMACHER et al. 1996; VAN DOORNUM et al. 1994; HEINO et al. 1995; ANDERSSON-ELLSTROM et al. 1996); a definição de valores de *cut-off* baseados na distribuição amostral estatística de populações amostrais específicas, portadoras de características previamente definidas - mulheres

saudáveis, livres de carcinoma, virgens ou crianças não expostas à doença (HAMSIKOVA et al. 1997; FISHER et al. 1996; VAN DOORNUM et al. 1998; DE SANJOSE et al. 1996; SASAGAWA et al. 1996) – e por meio da curva denominada como *Receiver Operating Characteristic Curve* (ROC) (NONNENMACHER et al. 1995).

Além disso, a abordagem de outra estratégia para definição de soropositividade em ensaios de ELISA-VLP de HPV-16 tornou-se necessária, devido à inexistência de soros comprovadamente negativos ou positivos para a prevalência de anticorpos contra HPV-16, que permitissem a definição *a priori* de um valor de *cut-off*.

Assim, a definição de um valor mínimo de soropositividade para anticorpos da classe IgG contra o HPV-16, detectados por meio de ELISA-VLP, após a normalização das densidades ópticas de todas as amostras em teste (cálculo do NAR), fundamentou-se na medida de dispersão baseada em percentis.

Os percentis representam o percentual de observações posicionadas abaixo do ponto indicado (25%, 50%, 75% ou 95%), quando todos os dados sorológicos foram colocados em ordem decrescente, sendo arbitrariamente definidos como valores de *cut-off* para os dados oriundos dos ensaios de ELISA.

Com o intuito de realizar as análises estatísticas e epidemiológicas aqui apresentadas, optou-se pela definição arbitrária do valor de percentil de 95% (1,6) desta distribuição como um valor de *cut-off*. Assim, todos os

resultados superiores 1,6 foram considerados como soropositivos e os inferiores a esse valor foram considerados como negativos.

3.8 ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO DE PSEUDOVÍRIONS DE HPV-16

A produção dos pseudovírions de HPV-16 e de BPV-1 seguiu o protocolo de transfecção e purificação descritos por BUCK et al. (2004) e está esquematizada na Figura 2. A detecção de anticorpos neutralizantes contra o HPV-16 foi realizada por meio de um novo formato de um ensaio de neutralização de pseudovírions de HPV-16, adaptado para microplacas de 96 poços (PASTRANA et al. 2004) e esquematizado nas Figuras 3 e 4.

3.8.1 Plasmídios e Linhagens Celulares

Os plasmídios utilizados no desenvolvimento deste ensaio incluíram as seguintes construções: o gene L1 de HPV-16 (püL1B), selecionado por blasticidina (Tabela 1, Figura 5), o gene L2 de HPV-16 (püL2), selecionado por ampicilina (Tabela 2, Figura 6), os genes L1 e L2 de BPV-1 (pSHELL), selecionados por kanamicina (Tabela 3, Figura 7) e o gene da fosfatase alcalina secretável, colocado a montante de uma origem de replicação do vírus SV40 e do promotor EF1- α de citomegalovírus (CMV), denominado de pYSEAP, e também selecionado por blasticidina (Tabela 4, Figura 8).

Tanto na produção dos pseudovírions de HPV-16 quanto no ensaio de neutralização de pseudovírions de HPV-16, a linhagem celular utilizada

foi a 293TT. Esta linhagem foi gerada a partir da transfecção da linhagem parental 293 T (que expressa constitutivamente o gene termo-sensível do antígeno T grande do SV40) (<http://www.atcc.org>) com o plasmídio pTIH linearizado e a subsequente seleção de clones com 400 µg de higromicina B/ml (BUCK et al. 2004).

Um conjunto de quatro ampolas de bactérias *Escherichia coli*, da linhagem JN109, foi transformado, respectivamente, com pūL1B, pūL2, pYSEAP e pSHELL e plaqueado com seus respectivos marcadores de seleção em meio LB Agar. Seis clones para cada plasmídio foram coletados, propagados em meio LB líquido e submetidos a uma Mini-Prep para extrair o DNA plasmidial. Cada clone foi submetido a uma reação de digestão enzimática com a enzima Pvu II para confirmação do inserto. Os clones que demonstraram maior expressão, definida visualmente por meio da intensidade das bandas no gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio 1mg/ml, foram escolhidos para fazer o estoque de cada um dos plasmídios. Para tanto, foram propagados em meio LB e posteriormente congelados a -80° C com glicerol 60%.

A linhagem celular 293TT foi cultivada em meio de propagação, constituído por DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) com vermelho de fenol, 10% Soro Fetal Bovino (SFB), 1% de Glutamax, 100mM (GIBCO-BRL) e 1% de Suplemento de Aminoácidos Não Essenciais 100mM (GIBCO-BRL) para a produção dos pseudovírions. Para os ensaios de neutralização de pseudovírions de HPV-16, as células 293TT foram cultivadas em meio de neutralização, constituído por DMEM sem vermelho de fenol, 10% SFB, 1%

de Glutamax, 100 mM, 1% de Suplemento de Aminoácidos Não Essenciais, 100 mM, 1% de HEPES (GIBCO-BRL) e 1% de Pen-Strep-Fungizone (GIBCO-BRL). O cultivo foi realizado a 37° C e a uma atmosfera de 5% de gás carbônico (CO₂) e o congelamento foi realizado em meio de propagação com 5% (v/v) de DMSO.

3.8.2 Geração dos Pseudovírus de HPV-16 e BPV-1

Os clones referentes aos quatro plasmídios foram amplificados em 500 ml de meio LB com os respectivos marcadores de seleção e purificados por meio dos protocolos de Maxi-Prep por Lise Alcalina e gradiente de cloreto de cério (CsCl) descrito por SAMBROOK e ROUSSEL (1999).

Duas garrafas T150, rotuladas para a produção de pseudovírus de HPV-16 e de BPV-1, respectivamente, foram pré-plaqueadas com células 293TT em meio de propagação, sem antibióticos, a uma concentração de 18×10^6 células/garrafa, cerca de 16 horas antes da realização do protocolo de transfecção.

O protocolo de transfecção foi realizado como se segue: 25 µg de cada DNA plasmidial (pYSEAP, pÜL1B e pÜL2 para geração de pseudovírus de HPV-16 ou pYSEAP e PSHELL para geração de pseudovírus de BPV-1) foram adicionados a 1875 µl de meio OPTI-MEM (GIBCO-BRL) e reservados. Um volume de 82.5 µl de Lipofectamina 2000 (INVITROGEN) foi adicionado a outros 1875 µl de OPTI-MEM e incubado à temperatura ambiente durante 5 minutos. Findo este período, a Lipofectamina foi misturada aos plasmídios e as soluções finais foram

incubadas à temperatura ambiente por outros 20 minutos. Após a incubação, cada uma das soluções de Lipofectamina/DNA (HPV-16 e BPV-1) foi adicionada a uma das garrafas de 293 TT. As células foram então incubadas a 37°C e 5% de CO₂ durante 6 horas. Finalmente, o meio de transfecção foi substituído por meio de propagação fresco e as células foram incubadas *overnight*. No dia seguinte, as células foram repicadas para quatro garrafas T150 (duas para os pseudovirions de HPV-16 e duas para os pseudovirions de BPV-1) e deixadas em repouso por mais 24 horas.

A coleta das células transfectadas foi realizada no dia posterior ao repique. Primeiro, o sobrenadante das garrafas foi coletado e reservado para recuperação de células transfectadas que estivessem em suspensão. As garrafas foram lavadas com 1,5 ml de Tripsina e incubadas com outros 1,5 ml de Tripsina a 37°C por 5 minutos. A seguir, as células tripsinizadas foram ressuspensas com o sobrenadante (previamente reservado) e centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em D-PBS (GIBCO-BRL) e contadas. Após um novo passo de centrifugação, as células foram ressuspensas em D-PBS com 10 mM de MgCl₂, a uma concentração de 1×10^8 células/ml.

A lise celular para recuperação dos pseudovirions foi efetuada por meio da adição de uma concentração final de 0,2% de uma solução de Brij 58 (SIGMA), 0,2% de benzonase (SIGMA) e de 0,1% de *Plasmid Safe* (EPICENTRE), seguida de incubação por 10-15 minutos a 37°C e por outro passo de incubação a temperatura ambiente *overnight*.

A purificação dos pseudovírions foi realizada por meio de um gradiente de soluções de 27%, 33% e 39% de OPTI-PREP (SIGMA) em um rotor Beckmann SW55. O gradiente foi montado cerca de 4 horas antes da adição das amostras, à temperatura ambiente. Quarenta minutos antes da formação dos gradientes, a preparação maturada do lisado celular foi colocada em gelo durante 10 minutos. Após este período, foi adicionado 0,17X volumes de NaCl 5 M a cada lisado e incubados novamente em gelo por 10 minutos. A seguir, os lisados foram centrifugados a 1500 x g, 4°C, durante 10 minutos e o sobrenadante resultante foi colocado no topo dos gradientes de OPTI-PREP.

Os tubos foram então balanceados e foi efetuada uma corrida de ultracentrifugação de 3,5 horas a 50.000 rpm, 16°C, com aceleração e desaceleração lentas. Após a ultracentrifugação, as frações foram coletadas em tubos siliconizados e guardadas a 4°C até que o processo de checagem das mesmas para a presença de pseudovírions – por meio de géis de SDS-PAGE e de um ensaio de neutralização de pseudovírions utilizando anticorpos monoclonais para titular a concentração de pseudovírions - estivesse terminado. As frações tituladas que continham os pseudovírions purificados foram reunidas, alíquotadas e armazenadas a -80°C por um período máximo de três meses.

3.8.3 Ensaio de Neutralização de Pseudovírions de HPV-16

A Figura 4 ilustra o esquema de uma microplaca de ensaio de neutralização de pseudovírions de HPV-16.

Cerca de 2-3 horas antes da realização do ensaio as células 293TT foram pré-plaqueadas em microplacas de 96 poços de fundo chato, tratadas para cultura de tecidos. Para realizar este pré-plaqueamento, as células foram tripsinizadas, ressuspendidas em meio de neutralização e contadas. Foram adicionados 100 μ l de meio de neutralização contendo 3×10^5 células/poço nos poços centrais da microplaca. Para evitar a evaporação dos poços externos, estes foram preenchidos com 200 μ l de meio de propagação. Após o plaqueamento, as células foram incubadas a 37°C em estufa até o momento em que a neutralização dos pseudovírions já estivesse terminada.

Em seguida, os soros em teste foram diluídos em meio de neutralização. Foram realizadas diluições de fator quatro, a partir de um título inicial de 1:40 até 1:2560. Estas diluições foram efetuadas em microplacas de poliestireno de 96 poços, seguindo a mesma disposição das placas de células. Este passo foi primordial para minimizar a adesão dos pseudovírions ao plástico das microplacas e, conseqüentemente, a perda de título.

Os pseudovírions de HPV-16 e BPV-1 foram diluídos dentre 1:1200-1:1500, de acordo com o resultado da titulação, em meio de neutralização e utilizando também tubos cônicos de poliestireno. Com o uso de uma pipeta multi-canal e de ponteiros siliconizadas, foram acrescentados 80 μ l da

solução de pseudovíriões aos 20 µl de soros em teste previamente diluídos nas microplacas em poliestireno. A seguir, as microplacas foram incubadas em gelo por uma hora, para permitir a eventual neutralização dos pseudovíriões pelos anticorpos presentes nos soros em teste.

Após a incubação, o *mix* de pseudovíriões/anticorpos foi adicionado às células pré-plaqueadas. As placas foram então incubadas a 37°C, 5% de CO₂ durante 72 horas.

3.8.4 Detecção Quimioluminescente da Fosfatase Alcalina Secretada nos Ensaios de Neutralização de Pseudovíriões de HPV-16

A detecção da fosfatase alcalina secretada, cuja produção foi induzida pela inserção do plasmídeo pYSEAP pelos pseudovíriões de HPV-16 ou BPV-1 em células 293 TT durante o ensaio de neutralização, foi realizada por meio do uso do *kit* de detecção de quimioluminescência denominado GREAT ESCAPE SEAP (BD/CLONTECH).

Após a incubação do ensaio por 72 horas a 37°C e 5% de CO₂, as placas foram retiradas da estufa e agitadas para misturar o meio. Em seguida, um volume de 60 µl foi removido de cada poço e transferido para uma placa de poliestireno. As placas foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos. Neste ponto, o protocolo pode ser interrompido e os sobrenadantes podem ser congelados a -20°C até o momento da revelação.

Para o protocolo de revelação, foram adicionados 45 µl do tampão de diluição 1X do *kit* a cada poço de uma microplaca de 96 poços opaca branca de fundo chato. Em seguida, 15 µl do sobrenadante clarificado dos ensaios

de neutralização de pseudovírions foram adicionados ao tampão de diluição de amostras e a placa foi coberta com filme plástico e incubada durante 30 minutos a 65°C, para inativar a fosfatase alcalina endógena das células.

A seguir, as placas foram incubadas em gelo durante 5 minutos. Findo este período, adicionou-se 60 µl de tampão de ensaio 1X a cada poço e a placa foi incubada a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Durante esta incubação, o substrato quimioluminescente foi preparado conforme as instruções do fabricante (1 parte do substrato para 19 partes do *enhancer*) e um volume de 60 µl por poço foi adicionado à placa. Esta foi então incubada a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Finalmente, a quimioluminescência da microplaca foi lida em um luminômetro e os valores de quimioluminescência foram medidos em unidades relativas de luminescência (URL). Foram considerados como resultados positivos de neutralização de pseudovírions os poços em que o valor médio de URL das amostras em teste foi inferior a 50% do valor médio de URL obtido pelos quatro poços controle contendo pseudovírions e nenhum anticorpo.

3.8.5 Definição dos Controles do Ensaio de Neutralização de Pseudovírions de HPV-16

A confiabilidade e a reprodutibilidade dos resultados obtidos em cada microplaca de ensaio de neutralização de pseudovírions de HPV-16 foram asseguradas pelos diversos tipos de controles utilizados (Figura 3).

O controle específico de neutralização dos pseudovirions de HPV-16 é realizado pelos anticorpos monoclonais denominados de HPV16.V.5 (CHRISTENSEN et al. 1996), que neutralizam os pseudovirions de HPV-16 a um título máximo de 25 milhões. O controle específico de neutralização dos pseudovirions de BPV-1 é realizado pelos anticorpos monoclonais denominados de 5.B.6 (BOOY et al. 1998), capazes de neutralizar os pseudovirions de BPV-1 a um título de 100.000.

O controle de fosfatase alcalina endógena basal das células 293TT é realizado pela detecção quimioluminescente do sobrenadante das células sozinhas, sem adição de pseudovirions ou anticorpos. O controle de fosfatase alcalina exógena máxima, na ausência de neutralização, é realizado pela detecção do sobrenadante das células infectadas com pseudovirions de HPV-16. Nesta situação, a inserção do plasmídio pYSEAP pelos pseudovirions de HPV-16 no citoplasma das células induz a produção máxima de fosfatase alcalina exógena.

Os pseudovirions de BPV-1 são utilizados como um controle adicional de especificidade da reação de neutralização realizada pelos anticorpos presentes nos soros em teste. Por motivos que ainda estão sob investigação, algumas amostras séricas, que apresentam neutralização de pseudovirions de HPV-16 a um título de 40, também neutralizam pseudovirions de BPV-1 neste mesmo título. Por sua vez, amostras que neutralizam pseudovirions de HPV-16 a um título de 160 ou maior não costumam neutralizar inespecificamente os pseudovirions de BPV-1.

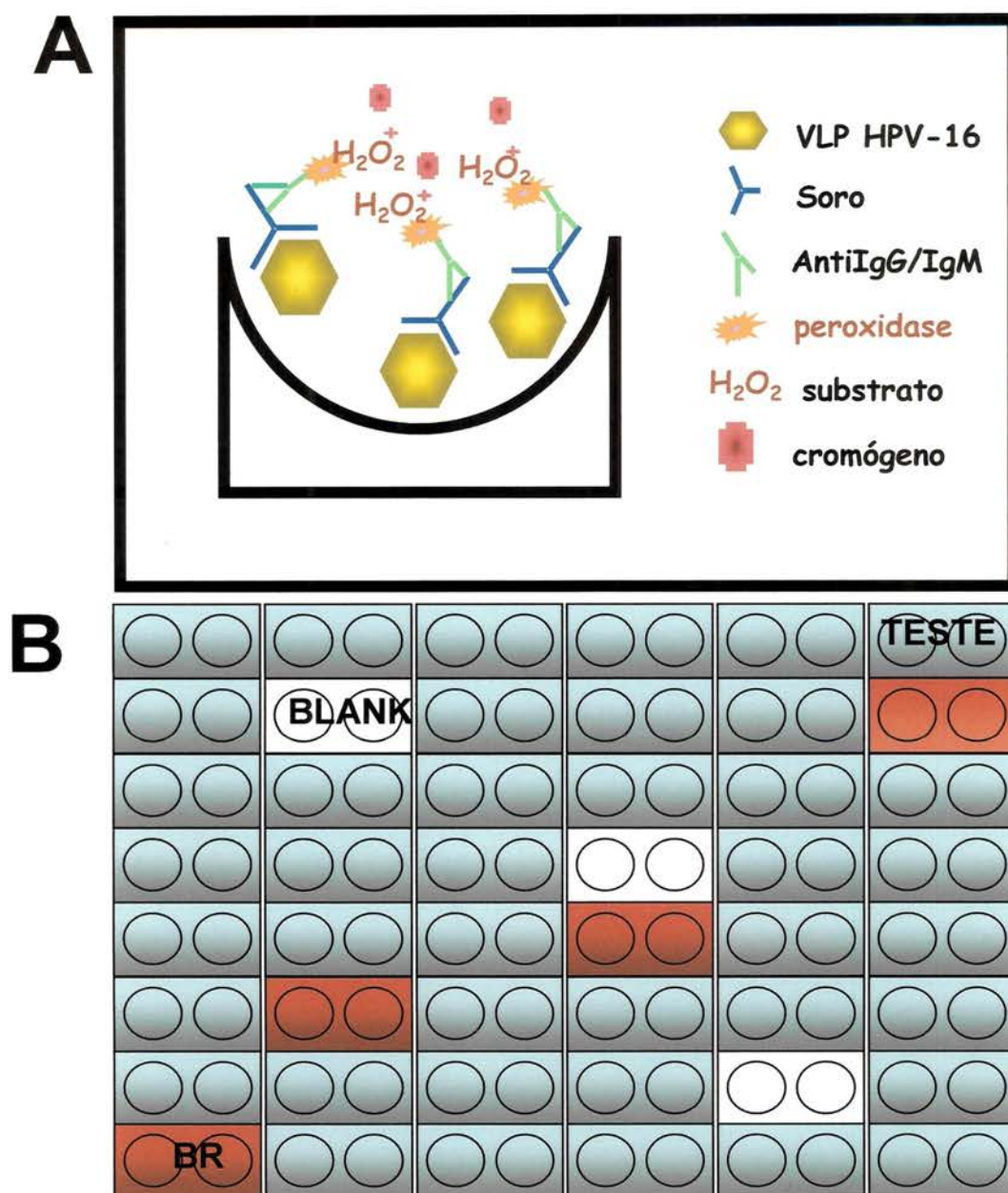
Assim, uma amostra sérica que neutraliza pseudovirions de HPV-16 a um título de 40 só é considerada especificamente neutralizante se ela **não** neutralizar os pseudovirions de BPV-1 neste mesmo título. Em caso contrário, ela é considerada como um soro neutralizante inespecífico e seu resultado é computado como negativo.

3.8.6 Definição da Positividade Sorológica

Devido a ausência de um valor de *cut-off* previamente reportado em literatura científica para definir a positividade para os anticorpos neutralizantes detectados pelo ensaio de neutralização de pseudovirions de HPV-16 e à necessidade premente de definir algum tipo de limiar para poder efetivar as análises estatísticas e epidemiológicas dos dados, optou-se por definir arbitrariamente o valor de *cut-off* para o ensaio de neutralização de pseudovirions de HPV-16.

A Tabela 5 ilustra a distribuição das frequências de indivíduos portadores de diversos níveis de anticorpos neutralizantes, detectados por meio do ensaio de detecção de pseudovirions de HPV-16, de acordo com os resultados da detecção de DNA de HPV-16. A análise cross-seccional (Tabela 5A) foi realizada com amostras séricas e esfregaços cervicais coletados à admissão ao estudo enquanto a análise cumulativa (Tabela 5B) foi realizada com amostras séricas coletadas à admissão ao estudo e com esfregaços cervicais colhidos ao longo do primeiro ano de seguimento do estudo.

O critério utilizado para a definição do valor de *cut-off* para o ensaio de neutralização de pseudovirions de HPV-16 foi demonstrado na Tabela 5, em que os níveis de anticorpos neutralizantes equivalentes ou superiores ao título de 640 compreendem o maior número possível de indivíduos positivos para a detecção de DNA de HPV-16 (12 na análise cross-seccional e 7 na análise cumulativa) e o menor número possível de indivíduos negativos para a detecção do DNA viral (2 na análise cross-seccional e nenhum na análise cumulativa). Assim, para prosseguir nas análises epidemiológicas oriundas desses dados, optou-se por definir a positividade para anticorpos neutralizantes como títulos equivalentes ou superiores a 640.



Legenda: **BLANK** – controle de ruído, contendo VLP, conjugado, H_2O_2 , OPD.
BR – controle de variabilidade intra e inter-ensaios.
TESTE – amostras séricas em teste, corridas em duplicatas.

Legenda: **A.** Esquema geral de um ELISA direto. Antígeno: VLP de HPV-16.
B. Esquema de uma microplaca de ELISA-VLP para HPV-16.

Figura 1: ELISA-VLP para detecção de anticorpos da classe IgG gerados contra o HPV-16.

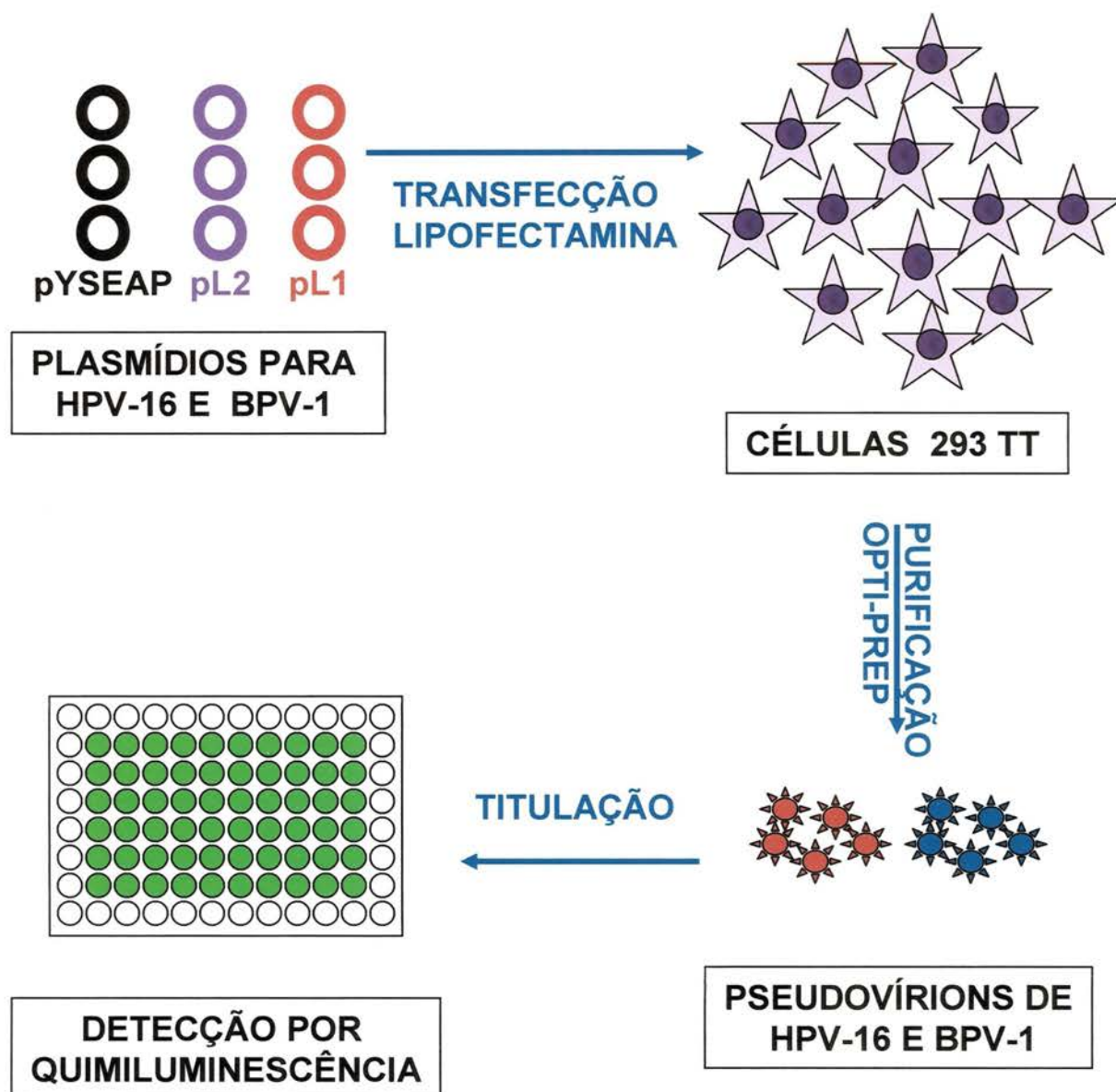


Figura 2: Esquema simplificado da produção de pseudovírions de HPV-16 e BPV-1.

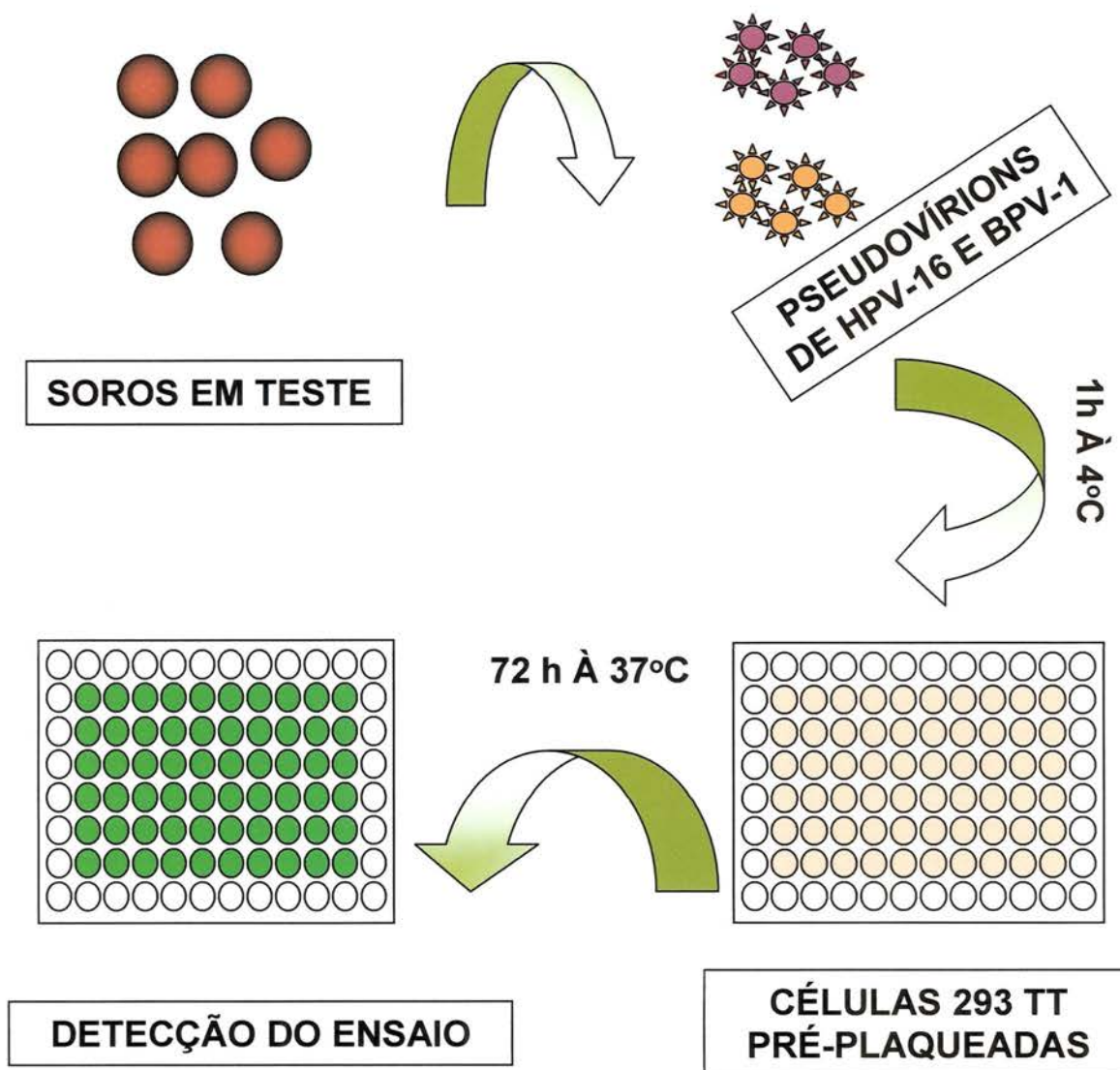


Figura 3: Esquema simplificado do ensaio de neutralização de pseudovírions de HPV-16.

	Amostras em teste								Controles		
	1	2	3	4	5	6	7	8			
	40	40	40	40	40	40	40	40			
	160	160	160	160	160	160	160	160			
	40	40	40	40	40	40	40	40			
	160	160	160	160	160	160	160	160			
	640	640	640	640	640	640	640	640			
	2560	2560	2560	2560	2560	2560	2560	2560			

Legenda: **Vermelho:** Poços externos preenchidos com 200 µl de meio de propagação para minimizar os efeitos da evaporação. **Verde:** Poços controle contendo pseudovirions de BPV-1. **Lavanda:** Poços controle contendo pseudovirions de BPV-1 associados ao anticorpo monoclonal específico 5.B.6 na diluição 1: 100.000. Branco: Poços controle contendo células 293 THi sem adição de pseudovirions ou de anticorpos – controle de produção endógena basal de fosfatase alcalina. **Azul claro:** Poços para teste contendo pseudovirions de HPV-16. **Alaranjado:** Poços controle contendo pseudovirions de HPV-16 associados ao anticorpo monoclonal específico 16.V.5 nas diluições 1:250.000, 1: 2.500.000, 1: 25.000.000 e 1: 250.000.000. **Azul escuro:** Poços controle contendo pseudovirions de HPV-16 sem adição de anticorpos. As amostras séricas em teste foram adicionadas em diluições seriadas de fator 4, iniciando em 1:40.

Figura 4 - Esquema de uma placa de ensaio de neutralização de pseudovirions de HPV-16.

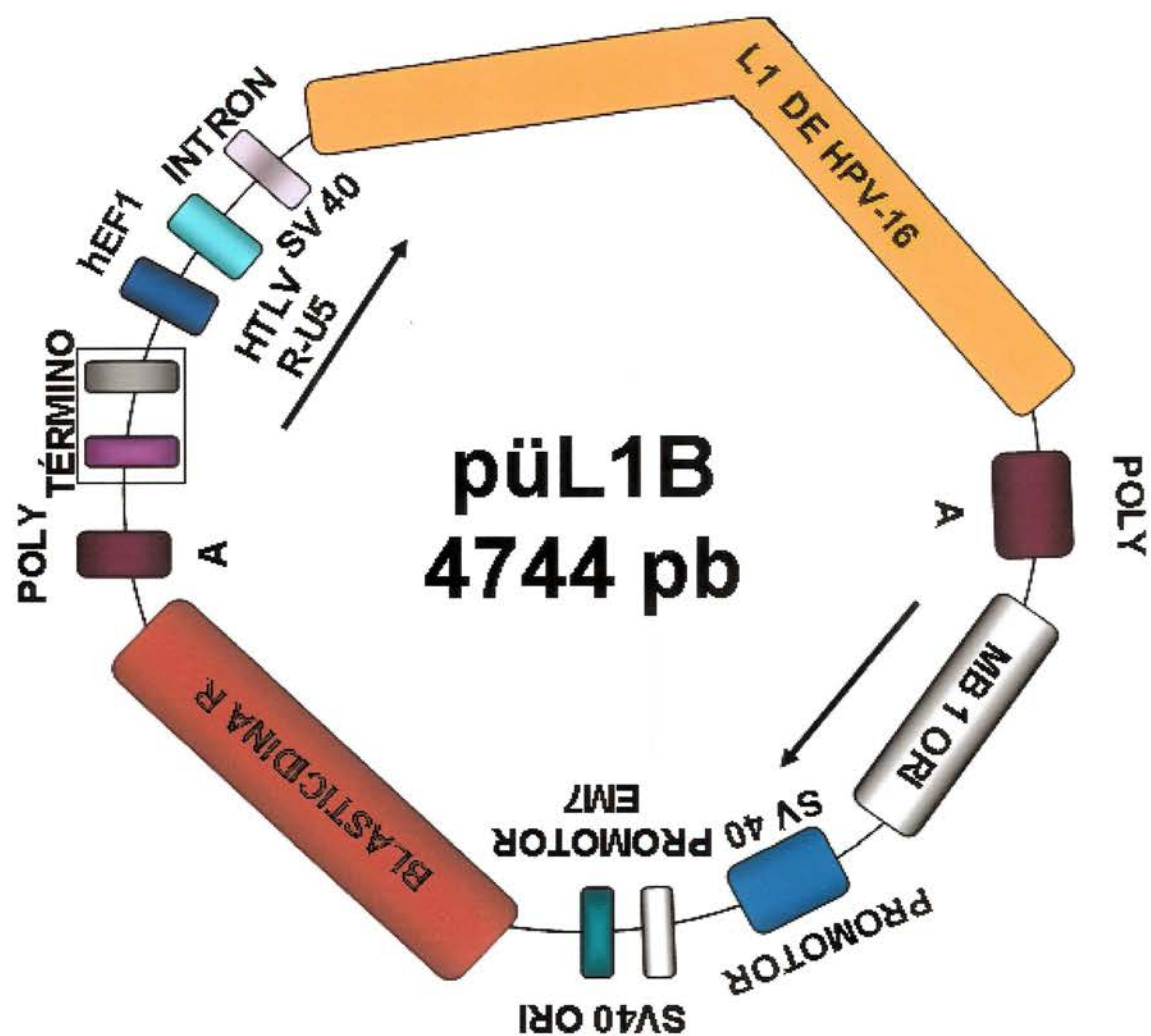
Tabela 1: Mapa físico do plasmídio pUL1B.

Legenda: Este vetor foi desenvolvido a partir de modificações realizadas no vetor parental pTR-FU3 (ZOLOTUKHIN et al. 1996) e a sequência completa do mesmo encontra-se disponível no site: <http://ccr.cancer.gov/staff/links.asp?staffID=443>.

Locus	Definição	Acesso	Palavra-Chave	Fonte
pUL1B.Gb	4744 pb <i>dsDNA</i>	Circular	"Syn"	10-Mar-2003

Características	Localização	Qualificativo
Promotor	13 - 249	"Core" do promotor hEF1 α
5' UTR	257 - 523	Sequência líder de HTLV-R-U5
Intron	664 - 758	Intron tardio de SV40
CDS	828 - 2345	L1 de HPV-16 (segundo Müller)
Sinal de Poly A	2397 - 2645	Poly A tardia de SV40
Origem de Replicação	2671 - 3393	MB1 Ori
Promotor	3415 - 3758	Promotor precoce de SV40
Origem de Replicação	3607 - 3758	SV40 Ori
Promotor	3793 - 3847	Promotor de EM7
CDS	3867 - 4289	Blasticidin R
Sinal de Poly A	4343 - 4560	Poly A de BGH
Sequência Finalizadora	4588 - 4641	Pausa de Transcrição (α 2 globina)
Sequência Finalizadora	4644 - 4737	Finalizador da Transcrição

Contagem de Bases	A	C	G	T	Outra
	1122	1360	1256	1006	0



Legenda: Sequência completa presente no site:
<http://ccr.cancer.gov/staff/links.asp?staffID=443>, locus puL1B.

Figura 5: Esquema do plasmídio püL1B.

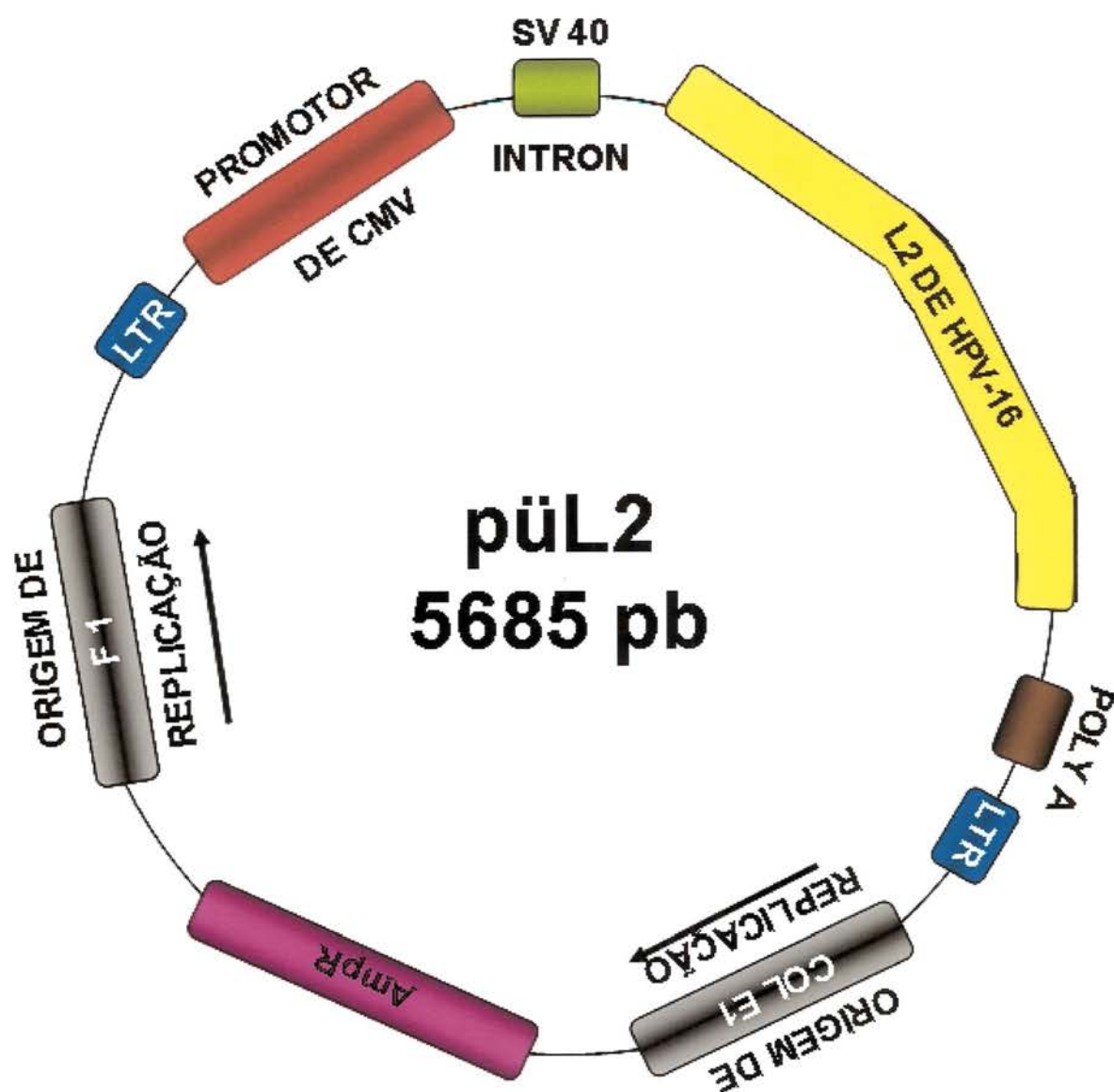
Tabela 2: Mapa físico do plasmídio püL2.

Legenda: Este vetor foi desenvolvido a partir de modificações realizadas no vetor parental pTR-UF3 (ZOLOTUKHIN et al. 1996) e a sequência completa do mesmo encontra-se disponível no site: <http://ccr.cancer.gov/staff/links.asp?staffID=443>.

Locus	Definição	Acesso	Palavra-Chave	Fonte
p16L2h.Gb	5685 pb <i>dsDNA</i>	Circular	"Syn"	27-Mar-2002

Característica	Localização	Qualificativo
Sequência LTR	1 - 167	AAV ITR
Promotor	180 - 708	Promotor de CMV r
Diferencial	800 - 859	Sequência homóloga ao SV40
Intron	827 - 921	Intron tardio de SV40
Diferencial	870 - 956	Sequência homóloga ao SV40
CDS	991 - 2412	L2 de HPV-16 (Segundo Muller)
Mutação	1924 - 1924	Silenciosa de C->T
Mutação	1978 - 1978	Silenciosa de C->T
Mutação	2011 - 2011	T no subclone "Cindy"
Mutação	2034 - 2034	Silenciosa de C->T
Mutação	2200 - 2200	Silenciosa de C->T
Sinal da cauda Poly A	2465 - 2676	Poly A de BGH
Sequência LTR	2679 - 2845	AAV ITR
Origem de Replicação	3032 - 3705	Col E1 Ori
CDS	Complementar (3850 - 4710)	AmpR
Origem de Replicação	5147 - 5603	F1 Ori

Contagem de Bases	A	C	G	T	Outra
	1351	1696	1470	1168	0



Legenda: Sequência completa presente no site:
<http://ccr.cancer.gov/staff/links.asp?staffID=443>, locus p16hL2.

Figura 6: Esquema do plasmídio püL2.

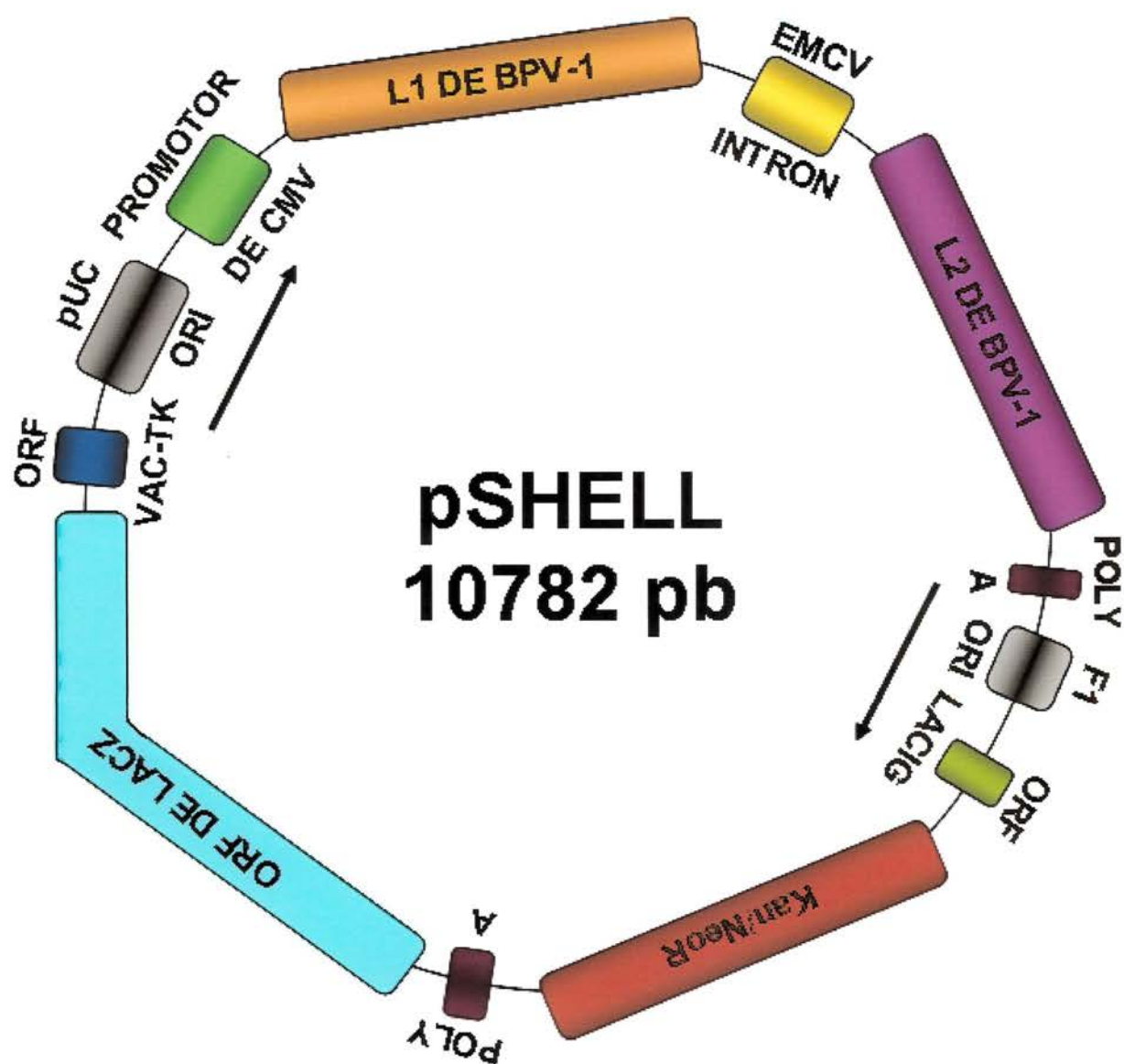
Tabela 3: Mapa físico do plasmídio pShell.

Legenda: Este vetor foi desenvolvido a partir de modificações realizadas no vetor parental pCI-PRE (BUCK et al. 2001) e a sequência completa do mesmo encontra-se disponível no site:
<http://ccr.cancer.gov/staff/links.asp?staffID=443>.

Locus	Definição	Acesso	Palavra-Chave	Fonte
pShell.Gb	10782 pb <i>dsDNA</i>	Circular	"Syn"	30-Jun-1997

Características	Localização	Qualificativo
Promotor	1 - >589	Promotor de CMV
RNA _m	583 - 583	Início da Transcrição
CDS	641 - >2129	L1 de BPV-1 "ADAP"
Intron	2165 - > 2740	EMCV IRES
CDS	2741 - > 4150	L2 de BPV-1 (Segundo Zhou)
Sítio de Poly A	4227 - 4232	Sinal de Poly A
Sinal de Poly A	4227 - 4277	Poly A de SV 40
Sítio de Poly A	4256 - 4261	Sinal pA
Origem de Replicação	4324 - > 4780	F1 Ori
CDS	5278 - 5361	ORF Lacig-junk
Diferencial	5278 - > 5303	Sequência Líder Lacig
CDS	5354 - 6148	Kan/NeoR
Sinal de Poly A	6326 - 6595	Sinal de pA de HSV-TK
Sítio de Poly A	6384 -6402	Sítios de pA de HSV-TK
CDS	6627 - >9641	ORF de LacZ (Split)
Víron	Complementar (9729 – 10009)	VacHind3fragJ (Split)
CDS	Complementar (9729 – 10007)	ORF de Vac TK
Origem de Replicação	10057 - 10700	PuC Ori

Contagem de Bases	A	C	G	T	Outra
	2466	3132	2903	2281	0



Legenda: Sequência completa presente no site:
<http://ccr.cancer.gov/staff/links.asp?staffID=443>, locus pSHELL.

Figura 7: Esquema do plasmídio pShell.

Tabela 4: Mapa físico do plasmídio pYSEAP.

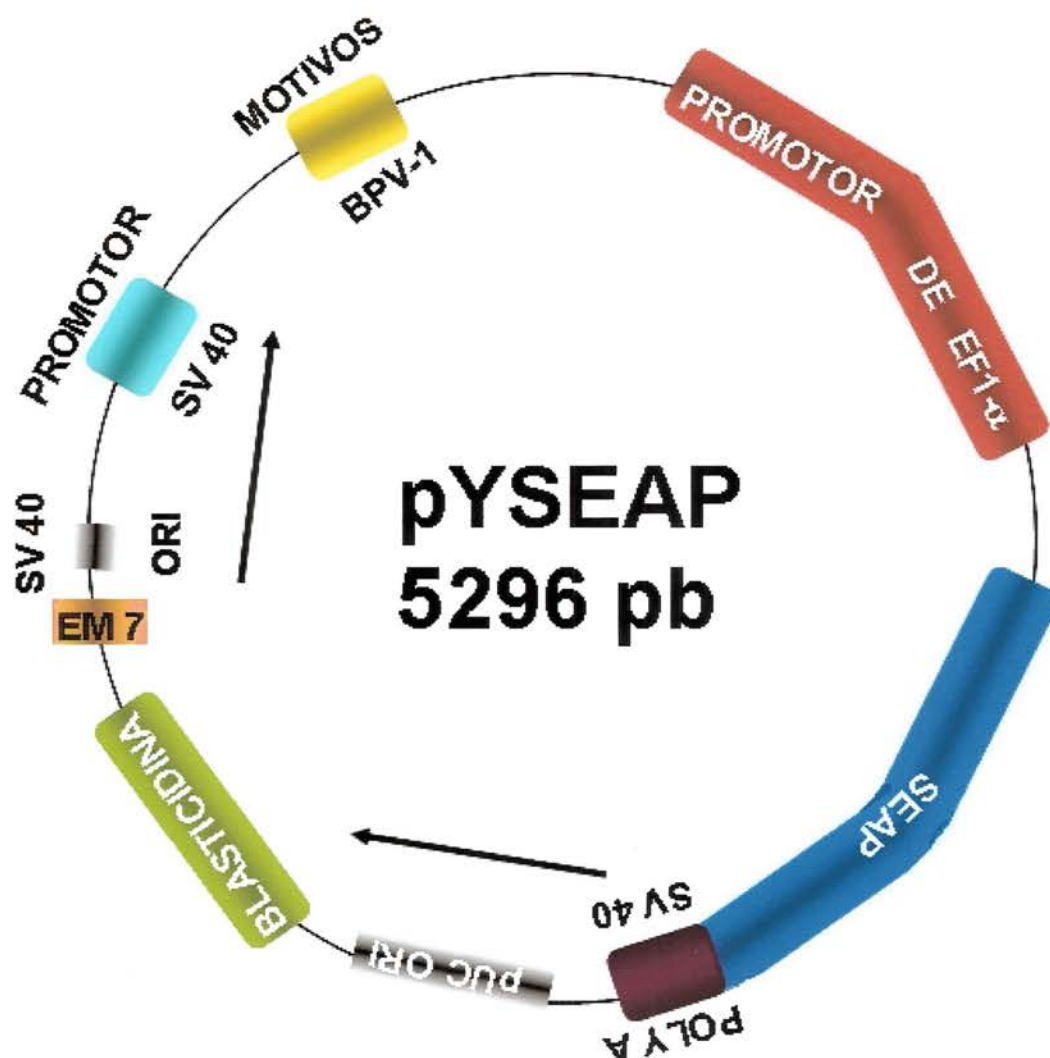
Legenda: Este vetor foi desenvolvido a partir de modificações realizadas no vetor parental pSEAP2Basic, comercialmente disponibilizado pela BD-Clontech. A sequência completa do mesmo encontra-se disponível no site:
<http://ccr.cancer.gov/staff/links.asp?staffID=443>.

Locus	Definição	Acesso	Palavra-Chave	Fonte
pYSEAP.Gb	5296 pb <i>dsDNA</i>	Circular	"Syn"	10-Mar-1998
Características	Localização		Qualificativo	
Diferencial	41 - > 166		Fragmento da URR de BPV1	
Recombinação Diferencial	167 - 377		Fragmento de E1 de BPV1	
Sinal Diferencial	201 - 320		Sinal de empacotamento de vírions (Segundo Zhao/99)	
Promotor	462 - 1640		Promotor de EF1 α	
Diferencial	462 - 659		"Core" do promotor de EF1 α	
Exon	660 - 692		Exon 1 de EF1 α	
Intron	693 - 1632		Intron A1 de EF1 α	
Exon	1632 - 1640		Exon 2 "líder" de EF1 α	
CDS	1726 - 3282		SEAP	
Sinal Diferencial	1726 - 1776		Peptídeo sinalizador	
Peptídeo Maduro	1777 - 3282		SEAP Maduro	
Diferencial	3244 - 3282		Extensão C-terminal	
Sinal de Poly A	3277 - 3498		Poly A de SV40	
Sítio de Poly A	3396 - 3401		Sinal de pA tardio de SV40	
Origem de Replilação	3794 - 4437		pUC Ori	
CDS	Complementar (4444 - < 4839)		BlasticidinR	
Promotor	Complementar (4858 - 4913)		EM7	
Origem de Replilação	Complementar (4948 - 5099)		SV40 Ori	
Promotor	Complementar (4961 - 5270)		Promotor precoce de SV40	
Região de Repetição	Complementar (5059 - 5122)		Repetições de 21 pb de SV40	
Enhancer	Complementar (5126 - 5197)		Repetições de 72 pb enhancer	
Enhancer	Complementar (5198 - 5270)		Repetições de 72 pb enhancer B	

Tabela 4: (continuação)

Locus	Definição	Acesso	Palavra-Chave	Fonte
pYSEAP.Gb	5296 pb <i>dsDNA</i>	Circular	"Syn"	10-Mar-1998

Contagem de Bases	A	C	G	T	Outra
	1122	1360	1256	1006	0



Legenda: Sequência completa presente no site:
<http://ccr.cancer.gov/staff/links.asp?staffID=443>, locus pYSEAP.

Figura 8: Esquema do plasmídio pYSEAP.

A

Título de Anticorpos Neutralizantes.	Detecção do DNA de HPV-16 por PCR		Total.
	Negativo	Positivo	
0 (Negativo)	73	18	91
40	15	10	25
160	13	4	17
640	2	5	7
2560	0	7	7
Total.	103	44	147

B

Título de Anticorpos Neutralizantes.	Detecção do DNA de HPV-16 por PCR		Total.
	Negativo	Positivo	
0 (Negativo)	35	56	91
40	2	23	25
160	4	13	17
640	0	7	7
2560	0	7	7
Total.	41	106	147

Legenda: **A.** Cross-seccional. **B.** Cumulativa.

Tabela 5 : Determinação arbitrária do *cut off* (box vermelho) para o ensaio e neutralização de pseudovirions de HPV-16, de acordo com a detecção de DNA de HPV-16

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

3.9.1 Associação entre Positividade Sorológica e Risco de Infecção pelo HPV

Conforme descrito anteriormente, a estratégia utilizada para a escolha das amostras a serem testadas, dentre aquelas provenientes de 2529 pacientes pertencentes à coorte do estudo prospectivo que vem sendo desenvolvido neste laboratório, fundamentou-se na seleção de uma amostragem caso-controle aninhada (*nested case-control sampling*).

Esse sistema de amostragem permite a utilização do cálculo das Razões de Chance (OR), como uma estimativa direta do Risco Relativo (RR), para a avaliação de ambas as medidas sorológicas (ELISA e ensaio de neutralização de pseudovírus).

Nesta abordagem, os indivíduos soropositivos apresentam riscos múltiplos da categoria de referência (grupo controle) para o desenvolvimento das variáveis analisadas, visto que a escolha dos controles deu-se dentre indivíduos pertencentes à mesma coorte e influenciados, portanto, pelos mesmos fatores externos que os casos (indivíduos apresentando detecção positiva do DNA de HPV) durante um longo período de seguimento.

Especialmente em algumas tabelas de contingência 2 X 2 geradas a partir de dados oriundos do teste para anticorpos neutralizantes, encontramos células em que o número de observações é inferior a 2. Para estes casos, a estimativa de OR foi calculada por meio do uso do Teste de Probabilidade Exata de Fisher.

A significância estatística das correlações encontradas e a precisão das estimativas calculadas foram corroboradas pelo cálculo dos intervalos de confiança a 95% (IC 95%).

Além disso, vale salientar que, embora o número amostral avaliado neste estudo seja de 150 amostras séricas, em algumas análises o número total de observações atingiu 146 ou 147 amostras. Os indivíduos excluídos das análises pertenciam a uma das seguintes categorias: 1. apresentavam apenas resultados pela técnica de ELISA-VLP, 2. apresentavam apenas resultados pelo ensaio de neutralização de pseudovirions e 3. apresentavam resultados para ambas as metodologias sorológicas, porém não apresentavam resultados para a detecção de DNA de HPV-16.

3.9.2 Avaliação da Validade e Confiabilidade das Medidas de Reatividade Sorológica

As ferramentas epidemiológicas mais comumente utilizadas para avaliar novas metodologias laboratoriais são as estimativas de sensibilidade, e especificidade. A sensibilidade mede a proporção de indivíduos positivos para uma determinada característica pelo método *gold standard* que são corretamente detectados pela nova metodologia em teste. A especificidade, por sua vez, mede a proporção de indivíduos negativos pelo método *gold standard* que são corretamente identificados pelo novo teste.

Assim, optou-se por avaliar a validade das medidas de exposição e resultado originadas pelo ensaio de ELISA-VLP e pelo ensaio de

neutralização de pseudovirions de HPV-16 por meio do cálculo dos valores de sensibilidade e especificidade.

A comparação entre as duas metodologias foi realizada por meio do cálculo da porcentagem de concordância total e do cálculo do valor de *kappa*.

A confiabilidade do ensaio de neutralização de pseudovirions de HPV também foi testada utilizando o cálculo do valor de *kappa* para os resultados obtidos por meio do teste de 100 amostras pareadas coletadas à admissão e após um ano de seguimento do estudo. Segundo LANDIS e KOCH (1977), valores de *kappa* inferiores ou iguais a 0.40 indicariam concordância pobre, 0,41-0,60 indicariam concordância moderada, 0,61-0,80 indicariam concordância excelente e de 0,81-1,00 indicariam concordância quase perfeita.

O coeficiente de Spearman é geralmente calculado em ocasiões em que não é conveniente, econômico ou possível observar valores reais para determinadas variáveis, mas somente designar uma escala de ordem para exemplos de cada variável. Trata-se de um melhor indicativo de existência de uma relação entre duas variáveis quando esta relação não é linear (<http://www.websters-online-dictionary.org>). Assim sendo, o coeficiente de Spearman foi calculado para testar a hipótese de que ambas as medidas sorológicas eram independentes.

3.9.3 Avaliação da Carga Viral de HPV-16

A variável carga viral de HPV-16 foi arbitrariamente dicotomizada em alta (>100 cópias/célula) e baixa (< 100 cópias/célula) carga viral. A eficiência das duas medidas de reatividade sorológica – ELISA e ensaio de neutralização de pseudovírus de HPV-16 - em prever o aparecimento de resultados positivos de carga viral de HPV-16 ao longo do primeiro ano de seguimento do estudo prospectivo foi avaliada de duas maneiras diversas.

Na primeira análise, a variável carga viral foi considerada uma variável binária e a eficiência de detecção foi avaliada por meio da estimativa de OR para ambos os testes.

Na outra análise, a carga viral foi considerada como uma variável contínua. Assim, dois tipos básicos de médias (aritmética e geométrica) foram calculados em três conjuntos de observações diferentes. O primeiro cálculo compreendeu o conjunto de dados de carga viral em geral, de maneira independente ao resultado sorológico (65 indivíduos). O segundo cálculo compreendeu somente o conjunto de dados de carga viral pertencente aos indivíduos que apresentavam uma detecção de baixos níveis de anticorpos neutralizantes (52 indivíduos). E, finalmente, o terceiro cálculo compreendeu apenas o conjunto de dados de carga viral pertencentes aos indivíduos que apresentavam uma detecção de níveis elevados de anticorpos neutralizantes à admissão (13 indivíduos).

Assim, a eficiência com que os níveis de anticorpos neutralizantes contra HPV-16 detectados em amostras coletadas à admissão do estudo correlacionavam-se às elevadas cargas virais de HPV ao longo do primeiro

ano de seguimento do estudo foi avaliada pela comparação entre as médias calculadas para os três conjuntos de observações.

4 RESULTADOS

A busca por uma estratégia de comparação dos resultados obtidos com o ensaio de neutralização de pseudovirions e com o ELISA-VLP fez com que exercitássemos alguns cálculos, que agora apresentaremos, na tentativa de avaliar de maneira matemática, embora não-significativa, algumas estimativas de validade.

Entretanto, algumas ressalvas devem ser levadas em conta. O ensaio de neutralização de pseudovirions de HPV-16 ainda não foi completamente validado em literatura científica, por tratar-se de uma metodologia muito recente. Além disso, ainda hoje há a existência de uma perene controvérsia com relação à melhor estratégia para definir valores de *cut-off* para metodologias sorológicas que detectam anticorpos anti-HPV. Finalmente, o baixo número amostral que foi submetido aos testes laboratoriais e, posteriormente, às análises estatísticas, contribuiu para que alguns dos resultados apresentados não apresentassem significância estatística, indicando apenas tendências de associação e não associações fortes.

A avaliação da validade e da reprodutibilidade de ambas as medidas foi realizada por meio do cálculo da sensibilidade e especificidade para ambas as metodologias, utilizando a detecção de DNA de HPV-16 por PCR como método *gold standard*. A análise de validade foi realizada utilizando dados cross-seccionais (Tabelas 6 e 7) para a detecção de DNA de HPV-16 por meio de PCR. Além disso, a detecção de uma metodologia sorológica foi

comparada à outra (Tabelas 8 e 9) e o valor de *kappa* foi calculado com o intuito de observar a extensão em que a concordância dentre estas metodologias implementava a concordância esperada ao acaso.

As análises cross-seccionais (Tabelas 6 e 7) para ambas as medidas sorológicas, utilizando-se a detecção do DNA de HPV-16 por PCR como método *gold standard*, denotam que, embora ambas as metodologias apresentem taxas de sensibilidade inferiores a 50%, a detecção por ELISA (45%) parece detectar mais indivíduos positivos do que o ensaio de neutralização (27%). Em termos de especificidade, ambas as metodologias apresentam índices muito bons (78% para ELISA e 98% para o ensaio de neutralização), embora o ensaio de neutralização apresente uma especificidade mais apurada.

As Tabelas 8 e 9 expressam os resultados obtidos quando as duas metodologias sorológicas são comparadas. O valor de *kappa* calculado foi de 21%, o que significa que a implementação que qualquer uma destas metodologias acrescenta ao que seria observado meramente por obra do acaso é mínima. A porcentagem de concordância total (75%), entretanto, indica que as duas metodologias tendem a concordar com relação à detecção da maioria das amostras testadas, podendo ser considerada boa. Essa correlação pode ser visualizada graficamente na Figura 9

Além disso, a técnica de ELISA detecta muito bem os indivíduos negativos, mas falha em detectar especificamente as infecções causadas por HPV-16 quando comparada ao ensaio de neutralização de pseudovírus de HPV-16 (Figura 12).

A Figura 9 ilustra graficamente a existência de uma tendência de concordância entre os níveis de anticorpos neutralizantes detectados por meio do ensaio de neutralização de pseudovírus de HPV-16 e os níveis de anticorpos mais elevados de soropositividade (definidos pelos percentis de 75% e 95%) detectados por meio do ensaio de ELISA-VLP para HPV-16 em um mesmo grupo de pacientes.

O cálculo do coeficiente de Spearman, utilizando os dados contidos na Tabela 8, originou um valor de 0,501, indicativo de que ambos os conjuntos de dados (detectados por ELISA e ensaio de neutralização) não são independentes, embora correlacionem-se fracamente. A representação gráfica dessa tendência de associação também está ilustrada na Figura 9.

A Tabela 10 indica os resultados obtidos na análise de amostras pareadas coletadas à admissão e após um ano de seguimento e testadas pelo ensaio de neutralização de pseudovírus. O valor do coeficiente de *kappa* foi calculado em 0,755, como uma estimativa de reprodutibilidade da técnica e resultou em uma concordância substancial entre os dois conjuntos de dados.

O próximo passo foi a comparação entre as duas metodologias de reatividade sorológica (ELISA e o ensaio de neutralização de pseudovírus de HPV-16) de acordo com a capacidade que mesmas demonstraram em detectar alguns dos indicadores de infecção pelo HPV-16 mais comuns, tais como infecção cumulativa, aquisição e eliminação de infecções, persistência e transiência de infecções e carga viral (Tabela 11).

As tendências de sensibilidade e especificidade calculadas a partir dos dados apresentados nas Tabelas 6 a 9 podem ser visualizadas de maneira gráfica nas Figuras 10 a 13.

A Figura 10 representa a prevalência da detecção do DNA de HPV-16 dentre as mulheres portadoras de níveis de anticorpos neutralizantes contra pseudovírus de HPV-16 à admissão em amostras de esfregaços coletadas à admissão do estudo, ou seja, de maneira cross-seccional.

A Figura 11, por sua vez, ilustra a prevalência cumulativa da detecção do DNA de HPV-16, ao longo do primeiro ano de seguimento do estudo, dentre as mulheres portadoras de níveis de anticorpos neutralizantes à admissão. Nota-se, em ambas as análises, que as mulheres que apresentaram níveis de anticorpos neutralizantes equivalentes ou superiores a 640 em amostras de soro coletadas à admissão do estudo apresentaram a frequência de detecção de positividade do DNA de HPV-16 compreendida entre 76 e 100%, tanto na medida cross-seccional quanto na cumulativa. Com relação às mulheres que apresentaram níveis de anticorpos neutralizantes inferiores a 160, notamos que a ausência de detecção de DNA de HPV-16 neste grupo de mulheres foi cerca de 80%.

Na Figura 12 pode ser notado que os altos níveis de anticorpos neutralizantes detectados à admissão do estudo parecem atuar como marcadores muito específicos de infecção concomitante pelo HPV-16, seja na forma de uma infecção isolada ou de uma infecção múltipla. Nota-se também nesta figura a presença de cerca de 18% de mulheres negativas para a detecção do DNA de qualquer tipo de HPV que apresentam níveis de

anticorpos neutralizantes contra HPV-16 equivalentes ou superiores a 640, indicando, provavelmente, um evento de cicatriz sorológica e uma exposição prévia ao HPV-16.

O aparecimento freqüente de níveis de anticorpos neutralizantes inferiores a 160 dentre as mulheres negativas para a detecção do DNA de qualquer tipo de HPV enfatiza a habilidade de discriminação deste ensaio dentre indivíduos negativos e infectados por HPV-16, pois os portadores de infecções correntes com este tipo viral invariavelmente apresentaram níveis de anticorpos neutralizantes equivalentes ou superiores a 640 à admissão ao estudo.

Outro aspecto a ser avaliado na Figura 12, que corrobora a maior taxa de especificidade do ensaio de neutralização de pseudovirions, é a frequência extremamente baixa de níveis de anticorpos neutralizantes inferiores a 160 dentre as mulheres portadoras de infecções por outros tipos oncogênicos de HPV, que também podem ser devidas a eventos prévios de exposição ao HPV-16 e a cicatrizes sorológicas.

A Figura 13, por sua vez, demonstra que os elevados níveis de anticorpos medidos por meio do ELISA-VLP parecem não ser tão específicos em discriminar as infecções pelo HPV-16 associadas a outros tipos oncogênicos. Pelo contrário, a detecção de anticorpos da classe IgG realizada pelo ELISA parece discriminar muito bem as mulheres negativas para a detecção do DNA de HPV daquelas que apresentam algum tipo de infecção, conforme notado pela alta prevalência de níveis mais baixos (75-80%) de soropositividade dentre estas mulheres. A taxa de 59% de

prevalência de níveis elevados de anticorpos detectados por ELISA dentre as mulheres negativas para a detecção de DNA de qualquer tipo de HPV deve-se a eventos de exposição prévia ao HPV e de cicatriz sorológica. Nota-se também que há uma detecção moderada (40%) de infecções concomitantes causadas unicamente pelo HPV-16, que se dilui muito quando o HPV-16 está associado a outros tipos de HPV (10%) ou quando as mulheres apresentam infecções por outros tipos de HPV oncogênico (5%).

A Figura 14 sumariza os dados demonstrados pelas Figuras 10 a 13 por meio da comparação da eficiência de ambas as metodologias de detecção de reatividade sorológica após o estabelecimento de um valor de *cut-off* arbitrário para ambas as técnicas. A soropositividade para ELISA foi arbitrariamente definida em valores de NAR superiores a 1,6, correspondente ao percentil 95% da distribuição descendente de todos os valores de NAR obtidos. A soropositividade para o ensaio de neutralização de pseudovirions de HPV-16 foi definida como níveis superiores ao título de 160.

Nota-se que a análise cross-seccional aqui demonstrada indica que o ensaio de neutralização apresenta uma detecção de negativas (alta especificidade) muito mais eficiente do que o ELISA. O ensaio de neutralização detectou quase 100% de soronegativas dentre as mulheres negativas para a detecção específica de HPV-16, enquanto que o ELISA detectou apenas cerca de 55% de soronegativas neste mesmo grupo. Embora o ELISA aparentemente detecte uma maior porcentagem de mulheres portadoras de infecções específicas causadas unicamente pelo

HPV-16 (17/35) quando comparadas com o ensaio de neutralização (07/35), o ensaio de neutralização tem uma melhor capacidade em detectar anticorpos gerados contra HPV-16 dentre aquelas mulheres portadoras de infecções múltiplas (causadas por HPV-16 em associação com outros tipos virais) do que o ELISA (05/09 contra 03/09, respectivamente). Finalmente, ambas as metodologias apresentam taxas semelhantes de detecção de anticorpos gerados contra HPV-16 dentre as mulheres portadoras de outros tipos de infecção (entre 10-20%).

Conforme pode ser observado na Figura 11, a especificidade do ensaio de neutralização de pseudovirions de HPV-16 atinge a marca dos 100% em análises cumulativas da presença do DNA de HPV-16 ao longo do primeiro ano de seguimento do estudo.

A Tabela 11 ilustra os principais resultados obtidos após o cálculo de OR (IC 95%) para os riscos das mulheres portadoras de anticorpos detectados por meio de ambas as metodologias de detecção sorológica à admissão do estudo apresentassem a detecção de diversas estimativas de infecção pelo HPV-16, ao longo do primeiro ano de estudo.

Nota-se nesta tabela, que as mulheres portadoras de anticorpos neutralizantes tiveram uma razão de risco cerca de 3 vezes maior do que as portadoras de anticorpos detectados pelo ELISA de terem uma infecção causada pelo HPV-16 detectada ao longo do primeiro ano de seguimento do estudo ou de adquirir uma nova infecção causada pelo HPV-16 na visita seguinte durante o acompanhamento do estudo.

A presença de células com valores nulos ou inferiores a 2 em tabelas de contingência 2 X 2, como as exemplificadas nas Tabelas 12 e 13 requer a utilização do Teste de Probabilidade Exata de Fisher para calcular a estimativa de risco, em vez da OR. Esse cálculo também foi utilizado na estimativa para o risco de desenvolver infecções cumulativas (dados não mostrados), conforme demonstrado pelo grande intervalo de confiança a 95% (Tabela 11).

A detecção de títulos equivalentes ou superiores a 640 de anticorpos neutralizantes à admissão do estudo elevou de 5 a 7 vezes a razão de risco destas pacientes de terem uma infecção HPV-16 persistente detectada ao longo do primeiro ano de seguimento, quando comparada à detecção de níveis elevados de anticorpos medidos por ELISA (Tabela 11). Os resultados foram similares para a determinação de persistência de infecções de HPV-16 ao longo do primeiro ano de seguimento, de maneira independente à categoria de referência utilizada: mulheres negativas para o DNA de HPV-16 ou aquelas que apresentaram apenas um evento de detecção do DNA de HPV-16.

As portadoras de níveis de anticorpos neutralizantes equivalentes ou superiores a 640 à admissão apresentaram uma razão de risco 4 vezes maior do que as portadoras de soropositividade medida por ELISA de terem uma infecção causada pelo HPV-16 com alta carga viral (superior a 100 cópias virais/célula), detectada ao longo do primeiro ano de seguimento do estudo (Tabelas 11, 14 e 15). A estimativa aproximada de OR também foi

calculada por meio do Teste de Probabilidade Exato de Fisher, conforme pode ser visto na Tabela 14.

A carga viral de HPV-16 foi também analisada como uma variável contínua, conforme demonstrado pela Tabela 16. Os resultados de carga viral global variam de 273 (média aritmética) e 7 (média geométrica). Quando os resultados de carga viral são analisados apenas para o grupo de mulheres portadoras de baixos níveis de anticorpos neutralizantes, nota-se que estas médias não se alteram significativamente (179-aritmética e 4-geométrica). Entretanto, quando a análise de carga viral é limitada apenas às mulheres portadoras de elevados níveis de anticorpos neutralizantes, observa-se uma elevação dos valores das duas médias (648-aritmética e 40-geométrica) que, novamente, corrobora a forte associação dentre a detecção de elevados níveis de anticorpos neutralizantes à admissão do estudo e o risco de detecção de infecções pelo HPV-16 de alta carga viral.

Entretanto, vale salientar que baixo número de observações desta última categoria (N=13) não permite que haja significância estatística para esta associação, que na melhor das hipóteses, pode ser considerada ainda como uma tendência.

Tabela 6: Comparação entre a detecção do DNA de HPV-16 por PCR e a detecção de anticorpos da classe IgG reativos contra VLP de HPV-16 à admissão ao estudo.

CROSS-SECCIONAL		Detecção do DNA de HPV-16 por PCR		Total N (%)
		Positivo N (%)	Negativo N (%)	
IgG anti VLP de HPV-16 (ELISA)	> 1,6 (positivo)	20 (47,6)	22 (52,4)	42 (100)
	< 1,6 (negativo)	24 (23,1)	80 (76,9)	104 (100)
	Total	44 (30,1)	102 (69,9)	146 (100)

Sensibilidade: $a / a + c$: 20 (positivos verdadeiros) / 20 + 24 (falsos negativos) = 0,45

Especificidade: $d / b + d$: 80 (negativos verdadeiros) / 22 (falsos positivos) + 80 = 0,78

Tabela 7: Comparação entre a detecção de DNA de HPV-16 por PCR e a detecção de anticorpos neutralizantes anti-pseudovírus de HPV-16 à admissão do estudo.

CROSS-SECCIONAL		Detecção do DNA de HPV-16 por PCR		Total N (%)
		Positivo N (%)	Negativo N (%)	
Anticorpo Neutralizante para HPV-16	≥ 640 (positivo) N (%)	12 (85,7)	02 (14,3)	14 (100)
	≤ 160 (negativo) N (%)	32 (24,1)	101 (75,9)	133 (100)
	Total	44 (29,9)	103 (70,1)	147 (100)

Sensibilidade: $a / a + c$: 12 (positivos verdadeiros) / 12 + 32 (falsos negativos) = 0,27

Especificidade: $d / b + d$: 101 (negativos verdadeiros) / 2 (falsos positivos) + 101 = 0,98

Tabela 8: Detecção de anticorpos circulantes da classe IgG reativos contra VLP de HPV-16 *versus* a detecção de anticorpos neutralizantes contra pseudovirions de HPV-16, à admissão do estudo

CROSS-SECCIONAL		Detecção de IgG anti VLP de HPV-16 por ELISA		Total N (%)
		> 1.6 (positivo) N (%)	< 1.6 (negativo) N (%)	
Anticorpo Neutralizante para HPV-16	≥ 640 (positivo) N (%)	09 (64,3)	05 (35,7)	14 (100)
	≤ 160 (negativo) N (%)	32 (24,2)	100 (75,8)	132 (100)
	Total	41 (28,1)	105 (71,9)	146 (100)

Valor de kappa: 0,21

Porcentagem de concordância total: 0,75

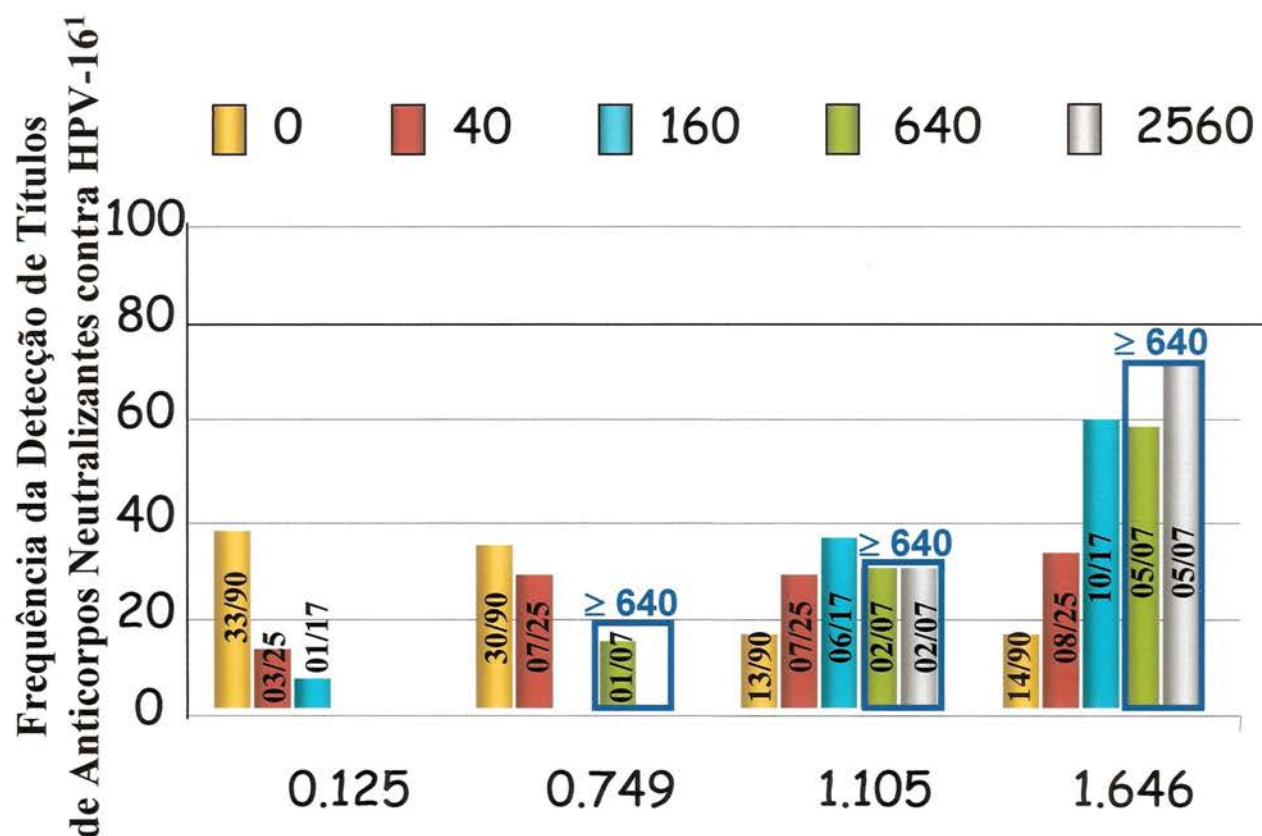
Coeficiente de Spearman: 0,501

Tabela 9: Detecção de anticorpos neutralizantes contra pseudovirions de HPV-16 *versus* a detecção de anticorpos circulantes da classe IgG reativos contra VLP de HPV-16, à admissão do estudo

CROSS-SECCIONAL		Anticorpo Neutralizante para HPV-16		Total N (%)
		≥ 640 (positivo) N (%)	≤ 160 (negativo) N (%)	
IgG anti VLP de HPV-16 (ELISA)	> 1,6 (positivo)	09 (22,0)	32 (78,0)	41 (100)
	< 1,6 (negativo)	05 (4,8)	100 (95,2)	105 (100)
	Total	14 (9,6)	132 (90,4)	146 (100)

Valor de kappa: 0,21

Porcentagem de concordância total: 0,75



Sororeatividade em ELISA VLP para HPV-16²
(percentis 25%, 50%, 75% e 95%)

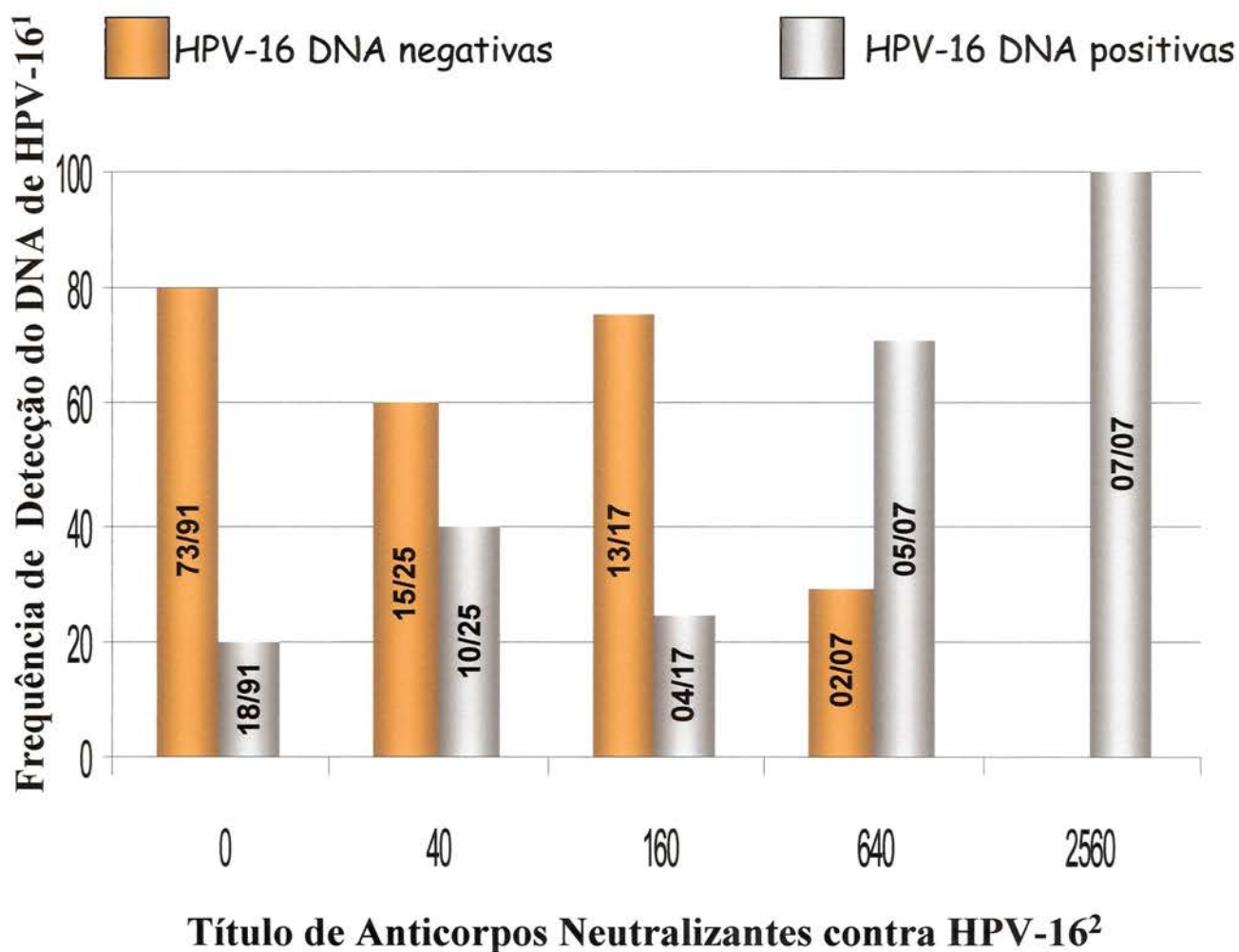
- Legenda:**
1. Porcentagem de mulheres com títulos de anticorpos neutralizantes que também apresentavam resultados em ELISA-VLP.
 2. A sororeatividade contra HPV-16 foi medida em amostras séricas coletadas à admissão do estudo.
 3. Sororeatividade expressa em razão de absorbância normalizada (NAR).
 4. Box azul representativo dos valores de *cut-off* do ensaio de neutralização de pseudovirions de HPV-16.

Figura 9: Comparação entre a detecção de diversos títulos de anticorpos neutralizantes contra HPV-16 e a detecção de sororeatividade em ELISA—VLP para HPV-16 definida por diferentes percentis em um mesmo grupo de mulheres à admissão ao estudo.

Tabela 10: Avaliação da detecção dos títulos de anticorpos neutralizantes contra o HPV-16 em amostras provenientes de um mesmo grupo de pacientes coletadas em dois momentos no tempo: à admissão e após um ano de seguimento do estudo.

Título de Anticorpos Neutralizantes À Admissão	Título de Anticorpos Neutralizantes Após um ano de Seguimento		Total N (%)
	≤ 160 N (%)	≥ 640 N (%)	
≤ 160 N (%)	89 (93,7)	06 (6,3)	95 (100)
≥ 640 N (%)	0 (0)	11 (100)	11 (100)
Total	89 (84,0)	17 (16,0)	106 (100)

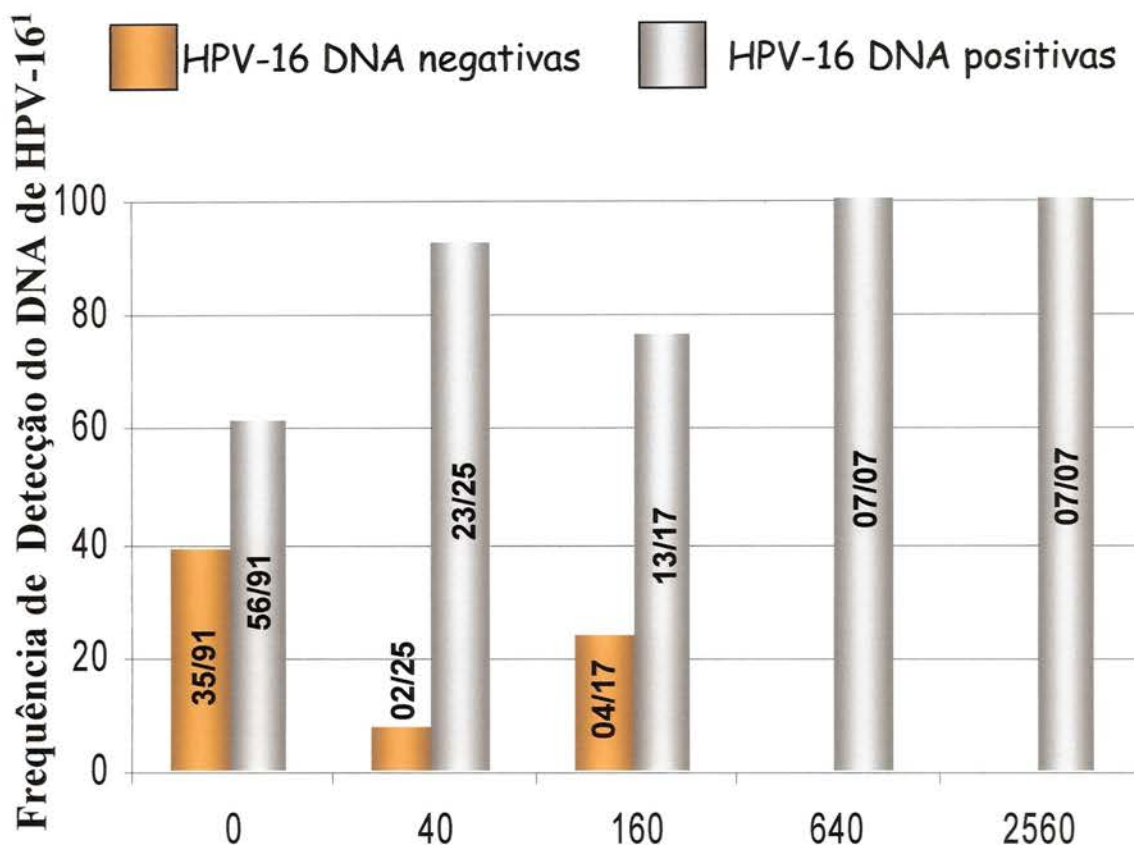
Valor de *kappa* = 0.755



Legenda:

1. Detecção de DNA de HPV-16 em esfregaços coletados apenas à admissão do estudo.
2. Títulos de anticorpos neutralizantes contra HPV-16 detectados em amostras séricas coletadas à admissão.

Figura 10: Prevalência da detecção do DNA de HPV-16 dentre as mulheres portadoras de variados títulos de anticorpos neutralizantes contra o HPV-16 à admissão ao estudo.



Título de Anticorpos Neutralizantes contra HPV-16²

Legenda:

1. Detecção de DNA de HPV-16 em esfregaços coletados durante o primeiro ano de seguimento do estudo.
2. Títulos de anticorpos neutralizantes contra HPV-16 detectados em amostras séricas coletadas à admissão.

Figura 11: Prevalência cumulativa da detecção do DNA de HPV-16 dentre as mulheres portadoras de variados títulos de anticorpos neutralizantes contra o HPV-16 à admissão ao estudo.

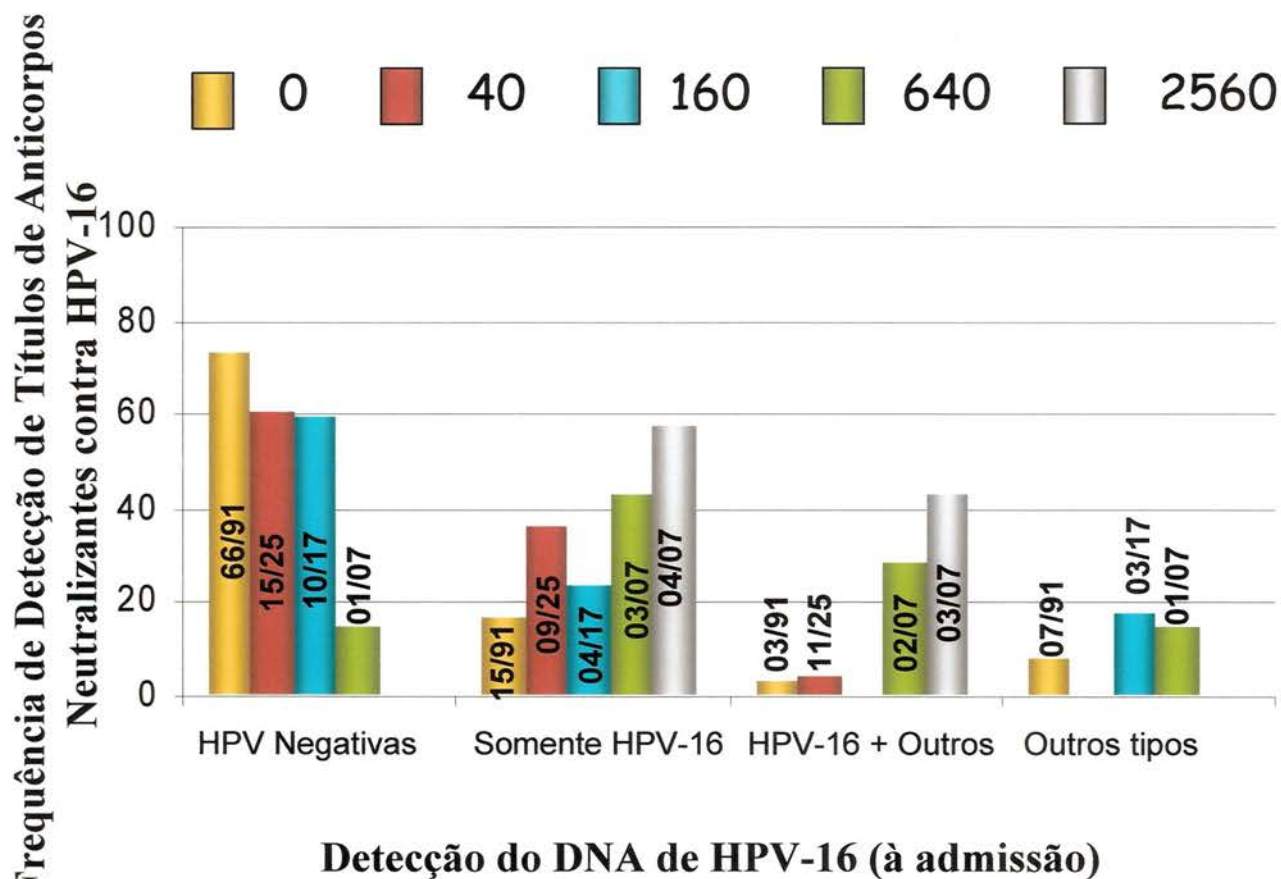


Figura 12 : Avaliação da especificidade do ensaio de neutralização de pseudovírus de HPV-16 em detectar infecções causadas pelo HPV-16

**Frequência de Detecção de Títulos de sororeatividade
em ELISA-VLP para HPV016**

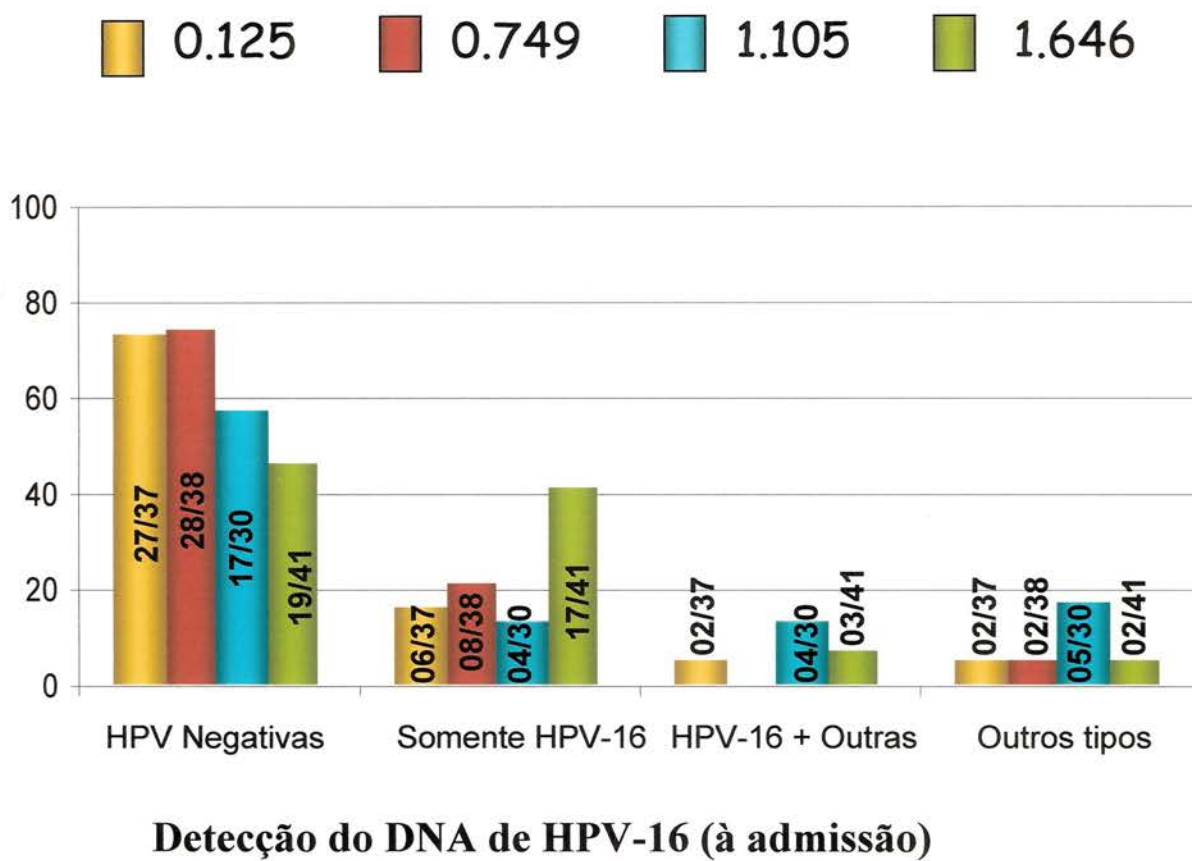
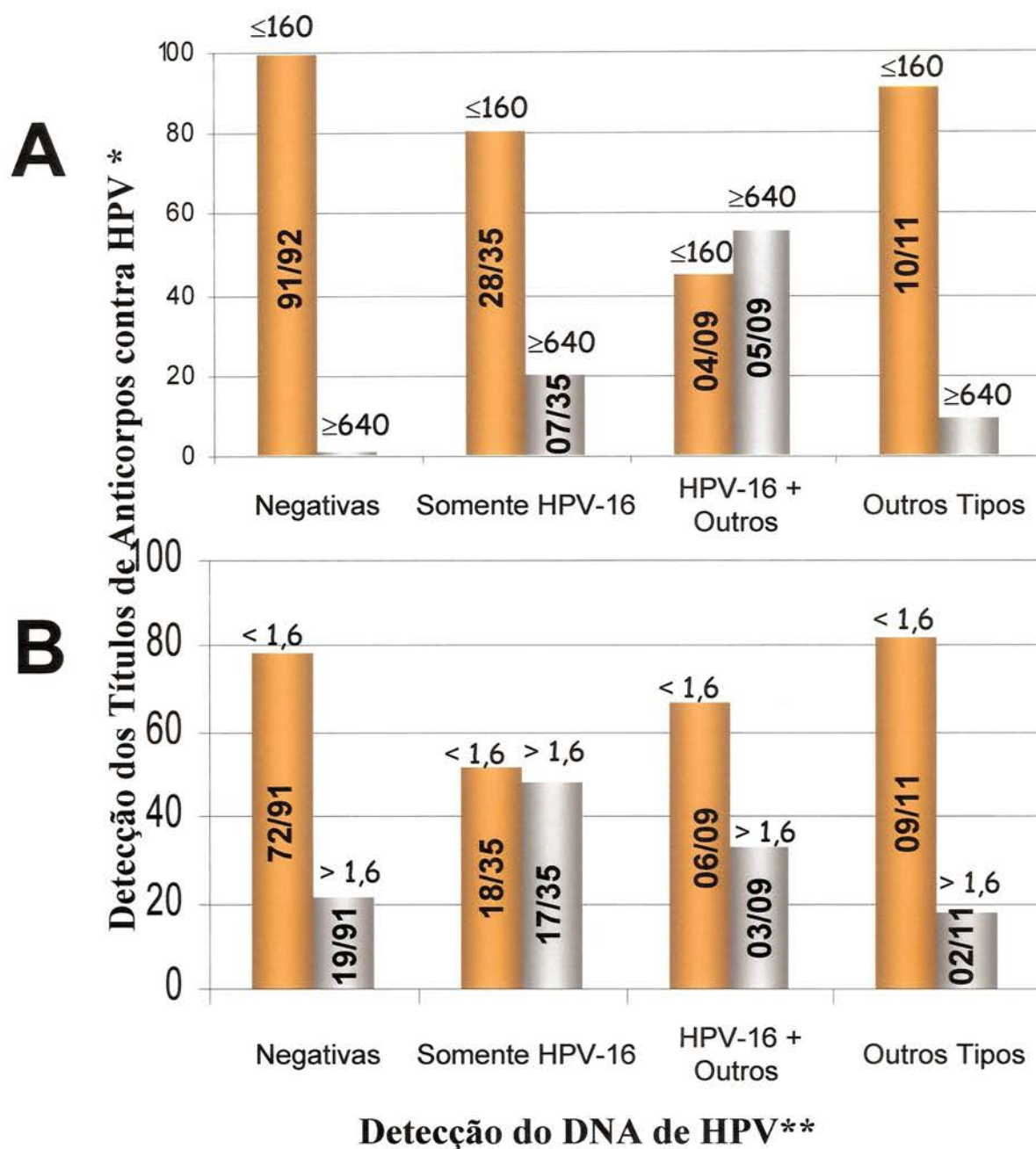


Figura 13: Avaliação da especificidade da sororeatividade em ELISA-VLP para HPV-16 em detectar infecções causadas pelo HPV-16



Legenda: A. Especificidade do ensaio de neutralização de pseudovirions de HPV-16

B. Especificidade para a soropositividade total de anticorpos da classe IgG medidos por ELISA.

* Porcentagem de mulheres com títulos de anticorpos neutralizantes contra o HPV-16 na visita 1.

** Detecção do DNA de HPV-16 DNA na visita 1.

Figure 14: Avaliação da especificidade de ambas as medidas de reatividade sorológica.

Tabela 11: Avaliação da detecção de anticorpos neutralizantes anti-pseudovirions de HPV-16 e de anticorpos reativos a VLP de HPV-16 em relação à evolução da infecção pelo HPV.

Infecção por HPV-16	Medidas de Reatividade Sorológica OR (Intervalo de Confiança 95%)	
	Anticorpos Neutralizantes	ELISA
Infecção Cumulativa	6,24 (0,88-270,1)	1,98 (0,82-4,73)
Aquisição de Infecções	3.45 (0.17-207.2)	1.09 (0.36-3.38)
Eliminação de Infecções	0.64 (0.16-2.58)	0.64 (0.19-2.16)
Carga Viral	4.05 (1.05-15.66)	0.64 (0.28-1.47)
Persistentes x Negativas	27.33 (2.02-1376.6)	4.12 (0.96-17.77)
Persistentes x Transientes	5.17 (1.50-17.83)	1.21 (0.52-2.80)

LEGENDA:

Infecção Cumulativa – caracterizada pela detecção de DNA de HPV-16 por PCR, ao longo do primeiro ano de seguimento do estudo.

Aquisição de Infecções – caracterizada pela detecção do DNA de HPV-16 por PCR quatro meses após a admissão ao estudo, em mulheres negativas à admissão.

Eliminação de Infecções – caracterizada pela ausência da detecção do DNA de HPV-16 por PCR quatro meses após a admissão ao estudo, em mulheres positivas à admissão.

Carga Viral – caracterizada por resultados de carga viral elevada (> 100 cópias/célula), ao longo do primeiro ano de seguimento.

Infecção Persistente – caracterizada pela detecção de dois ou mais resultados de DNA de HPV-16 por PCR, consecutivos ou não, ao longo do primeiro ano de seguimento do estudo.

Infecção Transiente – caracterizada pela detecção de um resultado de DNA de HPV-16 por PCR, ao longo do primeiro ano de seguimento do estudo.

Tabela 12: Avaliação da habilidade do ensaio de neutralização de pseudovírus e do ELISA em discriminar mulheres portadoras de infecções persistentes pelo HPV-16 daquelas consistentemente negativas ou das portadoras de infecções transientes pelo HPV-16 ao longo do primeiro ano de seguimento do estudo.

Tipo de Anticorpos	Tipo de Infecção por HPV-16		Total	Tipo de Infecção por HPV-16		Total
	Persistente	Negativa		Persistente	Transiente	
Neutralizantes						
$\leq 160 \text{ N } (\%)$	06 (12,8)	41(87,2)	47 (100)	30 (32,6)	62 (67,4)	92 (100)
$\geq 640 \text{ N } (\%)$	04 (100)	0 (0)	04 (100)	10 (71,4)	04 (28,6)	14 (100)
Total	10 (19,6)	41 (80,4)	51 (100)	40 (37,7)	66 (62,3)	106 (100)
ELISA	Persistente	Negativa	Total	Persistente	Transiente	Total
$< 1,6 \text{ N } (\%)$	09 (18,8)	39 (81,2)	48 (100)	26 (36,6)	45 (63,4)	71 (100)
$> 1,6 \text{ N } (\%)$	01 (33,3)	02 (66,7)	03 (100)	14 (41,2)	20 (58,8)	34 (100)
Total	10 (19,6)	41 (80,4)	51 (100)	40 (38,1)	65 (61,9)	105 (100)

Tabela 13: Avaliação da habilidade do ensaio de neutralização de pseudovírus e do ELISA em discriminar: 1. mulheres portadoras de infecções incidentes pelo HPV-16 daquelas consistentemente negativas ao longo do primeiro ano de seguimento do estudo e 2. mulheres que tiveram a eliminação da infecção pelo HPV-16 após quatro meses da admissão ao estudo daquelas em que houve persistência da infecção.

Tipo de Anticorpos	Tipo de Infecção por HPV-16		Total	Tipo de Infecção por HPV-16		Total
	Incidente	Negativa		Eliminada	Persistente	
Neutralizantes						
≤ 160 N (%)	21 (20,8)	80 (79,2)	101 (100)	14 (43,8)	18 (56,2)	32(100)
≥ 640 N (%)	02 (100)	0 (0)	02 (100)	04 (33,3)	08 (66,7)	12 (100)
Total	23 (22,3)	80 (77,7)	103 (100)	18 (40,9)	26 (59,1)	44 (100)
ELISA	Incidente	Negativa	Total	Eliminada	Persistente	Total
< 1,6 N (%)	17 (21,2)	63 (78,8)	80 (100)	11 (45,8)	13 (54,2)	24 (100)
> 1,6 N (%)	02 (10,5)	17 (89,5)	19 (100)	07 (35,0)	13 (65,0)	20 (100)
Total	19 (19,2)	80 (80,8)	99 (100)	18 (40,9)	26 (59,1)	44 (100)

Tabela 14: Avaliação da habilidade do ensaio de neutralização de pseudovirions em discriminar mulheres portadoras de infecções pelo HPV com elevada carga viral daquelas portadoras de baixa carga viral ao longo do primeiro ano de seguimento do estudo.

		Carga Viral de HPV		Total N (%)
		Elevada (> 100) N (%)	Baixa (0-100) N (%)	
Anticorpo Neutralizante para HPV-16	≥ 640 (positivo) N (%)	02 (100)	0 (0)	02 (100)
	≤ 160 (negativo) N (%)	31 (44,3)	39 (55,7)	70 (100)
	Total	33 (45,8)	39 (54,2)	72 (100)

Tabela 15: Avaliação da habilidade do ensaio de ELISA em discriminar mulheres portadoras de infecções pelo HPV com elevada carga viral daquelas portadoras de baixa carga viral ao longo do primeiro ano de seguimento do estudo.

		Carga Viral de HPV		Total N (%)
		Elevada (> 100) N (%)	Baixa (0-100) N (%)	
IgG anti VLP de HPV-16 (ELISA)	> 1,6 (positivo) N (%)	04 (12,5)	28 (87,5)	32 (100)
	< 1,6 (negativo) N (%)	13 (33,3)	26 (66,7)	39 (100)
	Total	17 (23,9)	54 (76,1)	71 (100)

Tabela 16: Carga viral de HPV, de acordo com os resultados da detecção de anticorpos neutralizantes de pseudovírus de HPV-16, através de um ensaio de neutralização de pseudovírus.

	Análise de Variável Contínua			
	Tipo de Média	Valor da Média	Intervalo de Confiança 95%	Número de Observações
Carga Viral em Geral	Aritmética	273.04	84.85 - 461.23	65
	Geométrica	7.12	3.37 - 15.07	
Carga Viral dentre os portadores de Baixos títulos de Anticorpos Neutralizantes (≤ 160)	Aritmética	179.39	25.91 - 332.88	52
	Geométrica	4.635	2.10 - 10.21	
Carga Viral dentre os portadores de Altos títulos de Anticorpos Neutralizantes (≥ 640)	Aritmética	647.61	-115.41 - 1410.64	13
	Geométrica	39.96	5.71 - 279.43	

5 DISCUSSÃO

A validade de um teste laboratorial é considerada como a extensão em que este instrumento é capaz de medir com exatidão aquilo a que se propõe. Ela só pode ser avaliada quando existe um outro procedimento de referência disponível que pode ser categorizado como um método *gold standard*, ou seja, um procedimento que indique quais amostras são esperadamente positivas ou negativas, para que o novo teste possa ser avaliado (SILVA 1999).

Os valores de sensibilidade (45%) e especificidade (78%) encontrados neste estudo para a detecção de anticorpos por meio de ELISA, quando o método *gold standard* utilizado era a detecção do DNA de HPV-16 nos esfregaços cervicais por PCR, foram muito similares aos encontrados em outras populações estudadas. Por exemplo, em mulheres paulistas portadoras de carcinoma cervical, as taxas de sensibilidade e especificidade encontradas para a metodologia do ELISA foram 47% e 76%, respectivamente, quando comparadas com a detecção por PCR do DNA de HPV (SUN et al. 1999). Em um estudo visando elevação de sensibilidade e especificidade dos ensaios de ELISA por meio da introdução de variados reagentes, STUDENTSOV et al. (2002) relataram uma taxa de 57% de sensibilidade e 78% de especificidade para o ELISA padrão, sem modificações.

A detecção de anticorpos neutralizantes pelo ensaio de neutralização de pseudovirions de HPV-16 apresentou pobres taxas de sensibilidade e elevadas taxas de especificidade, indicando que o seu uso poderia ser mais apropriado como um teste confirmatório, ao invés de um teste para *screening*.

De acordo com JECKELL et al. (1996), um teste de *screening* populacional ideal deveria apresentar uma elevada sensibilidade, pois este tipo de teste geralmente também apresenta uma baixa taxa de erro de falsos negativos, assegurando que poucos casos positivos serão perdidos. Os testes confirmatórios, por outro lado, devem apresentar elevadas taxas de especificidade, aliadas a uma baixa taxa de erro de falsos positivos, assegurando que poucos casos negativos receberão tratamento indevido.

A comparação feita entre as duas metodologias de reatividade sorológica indica novamente que o ensaio de neutralização de pseudovirions é mais específico (95%) do que sensível (22%) quando comparado ao ELISA (64% e 75%, respectivamente). PASTRANA et al. (2004) relatam no artigo que descreveu a técnica em uso neste estudo que o percentual de concordância dentre estas duas técnicas variava de 67-74% e que os valores de *kappa* variavam de 0,19 até 0,26. O valor de *kappa* de 0,21 calculado neste estudo encontra-se, portanto, dentro da faixa descrita em literatura, indicando que a execução da metodologia ocorreu da maneira esperada e que a transferência da metodologia entre laboratórios foi bem sucedida.

Este intervalo de valores de *kappa* pode ser considerado como indicativo de uma concordância pobre entre estas duas metodologias. E o intervalo de valores para os percentuais de concordância poderia indicar que o ensaio de neutralização seria mais sensível do que o ELISA.

Deve-se ressaltar que a hipótese de que os dados apresentados não reflitam de maneira completa a realidade ainda não pode ser descartada, visto que os cálculos foram todos baseados em um baixo número amostral e que o ensaio de neutralização de pseudovirions de HPV-16 ainda não foi devidamente validado em literatura.

De acordo com BRYAN et al. (1997), há uma correlação positiva entre a concentração de IgG total (medida por meio de ELISA) e a concentração de anticorpos neutralizantes (medida por meio do sistema xenográfico de camundongos atímicos com concentrações conhecidas de virions de HPV-11 purificados), determinadas em uma mesma amostra de soro de animais previamente imunizados com VLP. LEISEROWITZ et al. (1997) também descreveram que 45% dos indivíduos portadores de condilomas genitais possuíam anticorpos neutralizantes contra o HPV-11 (detectados por meio do sistema de camundongos atímicos) e eram fortemente sororeativos contra o HPV-11 em um ensaio de ELISA direto.

Ainda de acordo com a pouca literatura existente, esse fato poderia indicar uma co-existência entre anticorpos neutralizantes e não-neutralizantes no título total de anticorpos em um mesmo soro, ou seja, que ao menos uma fração dos anticorpos detectados por meio de ELISA-VLP também seria capaz de neutralizar pseudovirions de HPV-16 *in vitro*.

Assim, uma tendência de correlação dentre as duas metodologias, mesmo que de pobre concordância, seria esperada. O coeficiente de Spearman foi, então, calculado a partir dos dados contidos na Tabela 9, e indicou que há uma tendência de correlação, ainda que pobre, entre os dados provenientes do teste de ELISA e do ensaio de neutralização de pseudovírus.

Os anticorpos neutralizantes parecem manter-se relativamente estáveis ao longo do tempo, a julgar pela correlação alta (valor de *kappa* de 0,75) entre a detecção destes anticorpos em amostras de um mesmo grupo de pacientes coletadas à admissão e após um ano de seguimento do estudo (Tabela 10). A estabilidade para os anticorpos séricos gerados contra o HPV-16 e detectados por meio de ELISA-VLP ao longo do tempo foi previamente descrita em até 4 anos (AF GEIJERSSTAM et al. 1998). Além disso, esta análise também reforça o caráter de reprodutibilidade do ensaio de neutralização de pseudovírus.

A detecção sorológica de anticorpos séricos, medida por meio de ELISA-VLP, utilizando diversos tipos de HPV como antígeno, demonstra uma concordância considerável com a detecção do DNA viral na cérvix uterina. (DILLNER 1999). Assim, os resultados ilustrados nas Figuras 10 e 11, além de concordarem com os dados previamente estabelecidos em literatura, indicam o caráter altamente específico e acurado do ensaio de neutralização de pseudovírus de HPV-16 em detectar especificamente as infecções causadas pelo HPV-16.

Outros estudos empregando ELISA-VLP para HPV-16 relatam, por sua vez, uma prevalência crescente de anticorpos contra o HPV-16 principalmente nos grupos de indivíduos negativos para o DNA de HPV-16 (9-18%), de indivíduos positivos para outros tipos de HPV que não o HPV-16 (17-40%) e para os indivíduos positivos para o DNA de HPV-16 (28-56%) (SASAGAWA et al. 1996; WANG et al. 1997; VAN DOORNUM et al. 1998).

Assim, pode-se inferir a partir das Figuras 12 e 13 que, embora as taxas prevalências de detecção do DNA de HPV-16 ou de outros tipos de HPV dentre as mulheres portadoras de anticorpos, sejam eles neutralizantes ou não, corroborem taxas de prevalência previamente relatadas em literatura. Ademais, os resultados obtidos por meio do ensaio de neutralização de pseudovirions de HPV-16 realmente parecem discriminar de maneira mais eficiente mulheres infectadas pelo HPV-16 (em infecções únicas ou múltiplas) do que aqueles obtidos pelo ELISA-VLP.

Não poderia ser descartada a conhecida reatividade cruzada sorológica que o HPV-16 tem com outros tipos oncogênicos de HPV, tal como o HPV-33 (RODEN et al 1996b), em ensaios de ELISA, como uma explicação plausível para a ocorrência destas baixas taxas detecção de níveis elevados de soropositividade por ELISA em infecções múltiplas ou mesmo em mulheres portando infecções causadas por outros tipos oncogênicos de HPV. Assim, nota-se que a detecção de anticorpos neutralizantes à admissão do estudo parece atuar como um marcador muito mais específico de quaisquer infecções concomitantes causadas pelo HPV-16 do que os anticorpos contra HPV-16 detectados por meio do ELISA.

BURTON (2002) discorre em uma revisão sobre o papel crucial dos anticorpos neutralizantes na proteção obtida por meio de vacinação contra doenças virais, seja neutralizando as partículas virais livres ou direcionando a resposta imune celular contra as células infectadas. Entretanto, nada foi descrito até o momento com relação ao suposto papel destes anticorpos no contexto de uma infecção natural pelo HPV em mulheres não vacinadas.

Portanto, verificou-se qual o papel desempenhado pelos altos níveis de anticorpos neutralizantes contra HPV-16 detectados à admissão do estudo em eventos característicos da história natural da infecção pelo HPV, tais como a prevalência de infecções específicas pelo HPV-16, a aquisição de novas infecções também pelo HPV-16, a eliminação de infecções causadas pelo HPV-16, a persistência e transiência de infecções pelo HPV-16 e a carga viral de HPV-16.

Embora o número de amostras séricas testadas tenha sido baixo, o que prejudicou os resultados e a realização de algumas análises, algumas considerações interessantes podem ser feitas a respeito do papel dos anticorpos neutralizantes em um contexto de história natural da infecção pelo HPV-16.

A presença de altos níveis de anticorpos neutralizantes anti-pseudovirions de HPV-16 parece atuar como um marcador muito específico da infecção causada pelo HPV-16. A detecção de níveis elevados à admissão do estudo foi acompanhada pela detecção posterior de infecções cumulativas e pela detecção de infecções persistentes causadas pelo HPV-16 ao longo do primeiro ano de seguimento. Além disso, a aquisição de

novas infecções causadas pelo HPV-16 e a presença de elevadas cargas virais dentre as portadoras de infecção também foram previstas pela detecção de elevados níveis de anticorpos neutralizantes.

Em uma coorte de universitárias canadenses, a taxa de infecção cumulativa por HPV-16 foi calculada em 12%. Essas infecções apresentavam também a maior persistência (18,3 meses) e a maior frequência de aquisição (5,2 em cada 1000) (RICHARDSON et al. 2003).

A detecção positiva de HPV-16 com elevada carga viral elevou o risco de que as portadoras viessem a desenvolver uma lesão precursora de alto grau em cerca de 5 vezes (RAJEEVAN et al. 2005). A elevada carga viral de HPV-16, especificamente, foi responsável pela elevação do risco de que as portadoras viessem a desenvolver um carcinoma *in situ* de cerca de 37 vezes, quando comparada com os riscos calculados para as cargas virais elevadas de HPV-31 (3,2) e de HPV 18/45 (2,6) (MOBERG et al. 2005)

O estudo prospectivo Ludwig/McGill, visando investigar os fatores determinantes de risco da infecção pelo HPV e do desenvolvimento de neoplasias cervicais, gerou alguns resultados preliminares que suportam a consistência dos resultados acima descritos. Por exemplo, a presença de soropositividade à admissão, medida por meio de um ELISA-VLP utilizando capsídios de HPV-16, gerou uma razão de risco de 2,2 para o desenvolvimento de infecções cumulativas causadas por tipos oncogênicos de HPV (dentre os quais o HPV-16 apresenta a maior taxa de prevalência) ao longo do primeiro ano de seguimento. A razão de risco para a detecção de uma infecção persistente causada por tipos oncogênicos foi de 2,7 contra

a razão de risco de 1,2 para a detecção de infecções transientes (CANDEIAS et al. 1999; CANDEIAS 1998). A soropositividade à admissão também originou uma razão de risco de 3,1 para a detecção de uma alta carga viral de tipos oncogênicos durante o primeiro ano de seguimento do estudo (THOMANN et al. 2001). As leves diferenças das razões de risco calculadas anteriormente para as apresentadas aqui se devem, provavelmente, ao fato de que, no passado, foram utilizados os dados provenientes do grupo de HPV oncogênicos como um todo, ao passo que nas análises atuais apenas as infecções por HPV-16 foram incluídas.

DE GRUIJL et al. (1997) encontraram resultados sugestivos de que os anticorpos específicos contra VLP de HPV-16 não seriam responsáveis pela eliminação das lesões induzidas pelo vírus, mas poderiam ser indicativos de um risco aumentado para o câncer cervical em pacientes com infecções persistentes por HPV-16, funcionando mais como marcadores de progressão do que como agentes eliminadores de infecção. Nossos dados corroboram esta hipótese em parte, pois tanto a detecção de anticorpos neutralizantes quanto a detecção de anticorpos séricos contra VLP de HPV-16 não parece facilitar o processo de eliminação de infecções causadas por HPV-16 já estabelecidas, conforme demonstrado na Tabela 11.

A taxa de eliminação de infecções causadas pelo HPV é maior para as infecções causadas por tipos de baixa oncogenicidade - 12,2% e cerca de 170 dias de seguimento - do que aquela calculada para as infecções causadas por tipos de alta oncogenicidade - 9,5% e 226 dias de seguimento (FRANCO et al. 1999b; BROWN et al. 2005).

CARTER et al. (2000) descreveu que mulheres seguidas prospectivamente que apresentavam infecções incidentes pelo HPV dos tipos -16, -18, ou -6 soroconverteram dentro de um período de 18 meses após a detecção do DNA de HPV correspondente. Os dados demonstrados na Tabela 11 indicam que a detecção de anticorpos neutralizantes a admissão eleva para 3 vezes o risco da detecção de uma nova infecção especificamente causada pelo HPV-16 após um intervalo de 4 meses.

A taxa de aquisição de novas infecções causadas por HPV em mulheres negativas para a detecção de DNA viral e citologicamente normais apresenta-se dentro de um intervalo de 1-1,3% por mês. (FRANCO et al. 1999b; SYRJANEN et al. 2004).

Finalmente, depreende-se da Tabela 11 que a detecção de anticorpos neutralizantes parece atuar como um marcador muito mais eficiente de infecções correntes pelo HPV-16 do que a detecção de anticorpos medidos por meio do ELISA-VLP.

Os anticorpos neutralizantes correspondem ao principal mecanismo efetor da prevenção de doenças virais induzida pela imunização. No caso das infecções por HPV, a imunização profilática baseia-se na injeção de uma elevada concentração de VLP de HPV associada a adjuvantes como, por exemplo, o hidróxido de alumínio, capaz de produzir elevados níveis de anticorpos neutralizantes. Experimentos independentes de vacinação de mulheres jovens com VLP de HPV-16 demonstraram a indução de uma proteção absoluta contra infecções persistentes causadas pelo HPV-16 e contra lesões pré-malignas da cérvix uterina HPV-16 induzidas,

fundamentada em altos níveis de anticorpos neutralizantes que são capazes de persistir por até 18 meses após a vacinação (KOUTSKY et al. 2002). Curiosamente, embora a vacinação diminua a incidência de infecções transientes HPV-16 induzidas nas mulheres vacinadas, não a previne da mesma forma que o faz com as infecções persistentes (FRAZER 2004).

Os resultados preliminares demonstrados neste estudo indicam que os anticorpos neutralizantes produzidos durante o curso de uma infecção natural pelo HPV-16 atuam muito mais como marcadores específicos de infecção HPV-16 induzidas do que como mecanismos efetores de proteção contra infecções posteriores ou de eliminação de infecções correntes. Entretanto, serão necessários novos testes e novas análises para assegurar que as tendências aqui demonstradas refletem a realidade.

6 CONCLUSÕES

1. Os títulos de anticorpos neutralizantes equivalentes ou superiores a diluição 640 são marcadores específicos para a exposição ao HPV-16 em mulheres infectadas ao longo da história natural destas infecções virais.
2. Os níveis mais elevados de soropositividade contra HPV-16, detectados por meio de ELISA-VLP, demonstraram uma tendência de concordância com a detecção de anticorpos neutralizantes contra HPV-16.
3. Não houve correlação entre a detecção de elevados níveis de anticorpos gerados contra o HPV-16, seja por meio de ELISA-VLP ou do ensaio de neutralização de pseudovirions de HPV-16, e a eliminação de infecções causadas pelo HPV-16.
4. Os títulos de anticorpos neutralizantes equivalentes ou superiores a diluição de 640 foram significativamente associados com infecções prevalentes causadas pelo HPV-16, com a persistência das infecções causadas pelo HPV-16 e com elevadas cargas virais de HPV.

5. Os títulos de anticorpos neutralizantes foram relativamente estáveis durante o primeiro ano de seguimento do estudo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Af Geijersstam V, Kibur M, Wang Z, et al. Stability over time of serum antibody levels to human papillomavirus type 16. **J Infect Dis** 1998; 177:1710-4.

Andersson-Ellstrom A, Dillner J, Hagmar B, et al. Comparison of development of serum antibodies to HPV16 and HPV33 and acquisition of cervical HPV DNA among sexually experienced and virginal young girls. A longitudinal cohort study. **Sex Transm Dis** 1996; 23:234-8.

Bauer HM, Greer CE, Manos MM. Determination of genital human papillomavirus infection by consensus PCR amplification. **Diag Mol Pathol** 1992; 6:131-52.

Booy FP, Roden RB, Greenstone HL, Schiller JT, Trus BL. Two antibodies that neutralize papillomavirus by different mechanisms show distinct binding patterns at 13 Å resolution. **J Mol Biol** 1998; 281:95-106.

Bosch FX, De Sanjosé S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer –burden and assessment of causality. **J Natl Cancer Inst Monogr** 2003; 31:03-13.

Bousarghin L, Combita-Rojas AL, Touze A, et al. Detection of neutralizing antibodies against human papillomaviruses (HPV) by inhibition of gene transfer mediated by HPV pseudovirions. **J Clin Microbiol** 2002; 40:926-32.

Brinton LA, Reeves WC, Brenes MM, et al. The male factor in the etiology of cervical cancer among sexually monogamous women. **Int J Cancer** 1989; 44:199-203.

Brown DR, Shew ML, Qadadri B, et al. A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women. **J Infect Dis** 2005; 191:182-92.

Bryan JT, Jansen KU, Lowe RS, et al. Human papillomavirus type 11 neutralization in the athymic mouse xenograft system: correlation with virus-like particle IgG concentration. **J Med Virol** 1997; 53:185-8.

Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT. Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. **J Virol** 2004; 78:751-7.

Buck CB, Shen X, Egan MA, et al. The human immunodeficiency virus type 1 *gag* gene encodes an internal ribosome entry site. **J Virol** 2001; 75:181-91.

Burk RD, Ho GYF, Beardsley L, Lempa M, Peters M, Bierman R. Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. **J Infect Dis** 1996; 174:679-89.

Burton DR. Antibodies, viruses and vaccines. **Nat Rev Immunol** 2002; 2:706-13.

Caballero OL, Villa LL, Simpson AJ. Low stringency-PCR (LS-PCR) allows entirely internally standardized DNA quantitation. **Nucleic Acids Res** 1995; 23:192-3.

Candeias JMG. **Detecção de anticorpos contra HPV-16 em um estudo de história natural de infecções por papilomavírus humanos e sua relação com neoplasia cervical**. São Paulo; 1998. [Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas da USP].

Candeias JMG, Thomann P, Villa LL, Pintos J, Ferenczy A, Franco EL. Persistent HPV infection and cervical intraepithelial neoplasia can be predicted by serology to HPV-16 capsid antigens. In: **Proceedings of the 17th International Papillomavirus Conference**; 1999 Jan 9-15; Charleston, SC, USA.

Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, et al. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. **J Infect Dis** 2000; 181:1911-9.

Carter JJ, Koutsky LA, Wipf GC, et al. The natural history of human papillomavirus type 16 capsids antibodies among a cohort of university women. **J Infect Dis** 1996; 174:927-36.

Castellsague X, Ghaffari A, Daniel RW, Bosch FX, Muñoz N, Shah KV. Prevalence of penile human papillomavirus DNA in husbands of women with and without cervical neoplasia: a study in Spain and Colombia. **J Infect Dis** 1997; 176:353-61.

Christensen ND, Dillner J, Eklund C, et al. Surface conformational and linear epitopes on HPV-16 and HPV-18 L1 virus-like particles as defined by monoclonal antibodies. **Virology** 1996; 223:174-84.

de Gruijl TD, Bontkes HJ, Walboomers JM, et al. Immunoglobulin G responses against human papillomavirus type 16 virus-like particles in a prospective nonintervention cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. **J Natl Cancer Inst** 1997; 89:630-8.

De Sanjose S, Hamsikova E, Munoz N, et al. Serological response to HPV16 in CIN-III and cervical cancer patients. Case-control studies in Spain and Colombia. **Int J Cancer** 1996; 66:70-4.

Dillner J. The serological response to papillomaviruses. **Semin Cancer Biol** 1999; 9:423-30.

Durst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissman L. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. **J Gen Virol** 1985; 66:1515-22.

Fisher SG, Benitez-Bribiesca L, Nindl I, et al. The association of human papillomavirus type 16 E6 and E7 antibodies with stage of cervical cancer. **Gynecol Oncol** 1996; 61:73-8.

Franco EL, Rohan TE, Villa LL. Epidemiologic evidence and human papillomavirus infection as a necessary cause of cervical cancer. **J Natl Cancer Inst** 1999b; 91:506-11.

Franco E, Villa L, Rohan T, Ferenczy A, Petzl-Erler M, Matlashewski G. Design and methods of the Ludwig-McGill longitudinal study of the natural history of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Brazil. Ludwig-McGill Study Group. **Rev Panam Salud Publica** 1999a; 6:223-33.

Frazer IH. Immunology of papillomavirus infection. **Cur Opin Immunol** 1996; 8:484-91.

Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. **Nat Rev Immunol** 2004; 4:46-54.

Galloway. D. A. **Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomavirus**. Leeds: Leeds University Press; 1996. HPV Serology: Another Update. p.: 113-119.

Hamsikova E, Smahel M, Sapp M, et al. Correlation between the presence of anti HPV33 VLP antibodies and HPV DNA in cervical neoplasia patients. **Arch Virol** 1997;142:413-6.

Heino P, Eklund C, Fredriksson-Shanazarian V, Goldman S, Schiller JT, Dillner J. Association of serum immunoglobulin G antibodies against human papillomavirus type 16 capsids with anal epidermoid carcinoma. **J Natl Cancer Inst** 1995; 87:437-40.

Henry MR. The Bethesda System 2001: an update of new terminology for gynecologic cytology. **Clin Lab Med** 2003; 23:585-603.

Herbst AL. The Bethesda system for cervical/vaginal cytologic diagnosis. **Clinic Obstet Gynecol** 1992; 35:22-7.

Hildesheim A, Gravitt P, Schiffman MH, et al. Determinants of genital human papillomavirus infection in low income women in Washington DC. **Sex Transm Dis** 1993; 20:279-85.

Ho GY, Studentsov Y, Hall CB, et al. Risk factors for subsequent cervicovaginal human papillomavirus (HPV) infection and the protective role of antibodies to HPV-16 virus-like particles. **J Infect Dis** 2002; 186:737-42.

Howley PM. Papillomavirinae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. **Fundamental virology**. 3th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p.947-77.

IARC - International Agency For Research On Cancer. Human papillomavirus. In: Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon; 1995. v.64.

Jeckell JF, Elmore JG, Katz DL. Understanding and Reducing Errors in Clinical Medicine. In: Jeckell JF, Elmore JG, Katz DL, editors. **Epidemiology, Biostatistics and Preventive Medicine**. Philadelphia: WB Saunders; 1996. p.85-97.

Jochmus I, Schafer K, Faath S, Muller M, Gissmann L. Chimeric virus-like particles of the human papillomavirus type 16 (HPV 16) as a prophylactic and therapeutic vaccine. **Arch Med Res** 1999; 30:269-74.

Kawana K, Yasugi T, Kanda T, et al. Neutralizing antibodies against oncogenic human papillomavirus as a possible determinant of the fate of low-grade cervical intraepithelial neoplasia. **Biochem Biophys Res Commun** 2002; 296:102-5.

Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, et al. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assemble into virus-like particles that are highly immunogenic. **Proc Natl Acad Sci USA** 1992; 89:12180-4.

Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H, et al. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. **J Virol** 1993; 67:6929-36.

Kirnbauer R, Hubbert NL, Wheeler CM, Becker TM, Lowy DR, Schiller JT. A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. **J Natl Cancer Inst** 1994; 86:494-9.

Klaes R, Woerner SM, Ridder R, et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. **Cancer Res** 1999; 59:6132-6.

Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, et al. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. **N Engl J Med** 2002; 347:1645-51.

Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics** 1977; 33:159-174.

Lehn H, Villa LL, Marziona F, Hilgarth M, Hillemans HG, Sauer G. Physical state and biological activity of human papillomavirus genomes in precancerous lesions of the female genital tract. **J Gen Virol** 1988; 69: 187-96.

Leiserowitz GS, Hall KS, Foster CA, et al. Detection of serologic neutralizing antibodies against HPV-11 in patients with condyloma acuminata and cervical dysplasia using an in vitro assay. **Gynecol Oncol** 1997; 66:295-9.

Li M, Cripe TP, Estes PA, et al.. Expression of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in Escherichia coli: characterization of proteins domains involved in DNA binding and capsid assembly. **J Virol** 1997; 71:2988-95.

Lörincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of common anogenital types. **Obstet Gynecol** 1992; 79:328-37.

Lowe RS, Brown DR, Bryan JT, et al. Human papillomavirus type 11 (HPV-11) neutralizing antibodies in the genital mucosal secretions of African green monkeys immunized with HPV-11 virus-like particles expressed in yeast. **J Infec Dis** 1997; 176:1141-5.

Maciag PC, Schlecht NF, Souza PS, Franco EL, Villa LL, Petzl-Erler ML. Major histocompatibility complex class II polymorphisms and risk of cervical cancer and human papillomavirus infection in Brazilian women. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2000; 9:1183-91.

Maciag PC, Schlecht NF, Souza PS, Rohan TE, Franco EL, Villa LL. Polymorphisms of the human leukocyte antigen DRB1 and DQB1 genes and the natural history of human papillomavirus infection. **J Infect Dis** 2002; 186:164-72.

Makni H, Franco EL, Kaiano J, et al. P53 polymorphism in codon 72 and risk of human papillomavirus-induced cervical cancer: effect of inter-laboratory variation. **Int J Cancer** 2000; 87:528-33.

Matsumoto K, Kawana K, Yoshikawa H, Taketani Y, Yoshiike K, Kanda T. DNA vaccination of mice with plasmid expressing human papillomavirus 6 major capsid protein L1 elicits type-specific antibodies neutralizing pseudovirions constructed in vitro. **J Med Virol** 2000; 60:200-4.

Meschede W, Zumbach K, Braspenning A, et al. Antibodies against early proteins of human papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cancer. **J Clin Microbiol** 1998; 36:475-80.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer/Ministério da Saúde. **Estimativas 2005: incidência e mortalidade por câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2004.

Moberg M, Gustavsson I, Gyllensten U. Type-specific associations of human papillomavirus load with risk of developing cervical carcinoma in situ. **Int J Cancer** 2004; 112:854-9.

Muñoz N, Bosch FX. The causal link between HPV and cervical cancer and its implications for prevention of cervical cancer. **Bull Pan Am Health Organ** 1996; 30:362-77.

Murakami M, Gurski KJ, Steller MA. Human papillomavirus vaccines for cervical cancer. **J Immunother** 1999; 22:212-8.

Nagai Y, Toma T, Moromizato H, et al. Persistence of human papillomavirus infection as a predictor for recurrence in carcinoma of the cervix after radiotherapy. **Am J Obstet Gynecol** 2004; 191:1907-13.

Nakagawa M, Viscidi R, Deshmukh I, et al. Time course of humoral and cell-mediated immune responses to human papillomavirus type 16 in infected women. **Clin Diagn Lab Immunol** 2002; 9:877-82.

Nonnenmacher B, Kruger Kjaer S, Svare EI, et al. Seroreactivity to HPV16 virus-like particles as a marker for cervical cancer risk in high-risk populations. **Int J Cancer** 1996; 68:704-9.

Nonnenmacher B, Hubbert NL, Kirnbauer R, et al. Serologic response to human papillomavirus type 16 (HPV-16) virus-like particles in HPV-16 DNA-positive invasive cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia grade III patients and controls from Colombia and Spain. **J Infect Dis** 1995; 172:19-24.

Opalka D, Lachman CE, MacMullen SA, et al. Simultaneous quantitation of antibodies to neutralizing epitopes on virus-like particles for human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18 by a multiplexed luminex assay. **Clin Diagn Lab Immunol** 2003; 10:108-15.

Olsen AO, Dillner J, Gjoen K, Sauer T, Orstavik I, Magnus P. A population-based case-control study of human papillomavirus-type-16 seropositivity and incident high-grade dysplasia of the uterine cervix. **Int J Cancer** 1996; 68:415-9.

Palker TJ, Monteiro JM, Martin MM, et al.. Antibody, cytokine and cytotoxic T lymphocyte responses in chimpanzees immunized with human papillomavirus virus-like particles. **Vaccine** 2001; 19:3733-43.

Pastrana DV, Buck CB, Pang YY, et al. Reactivity of human sera in a sensitive, high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV16 and HPV18. **Virology** 2004; 321:205-16.

Pastrana DV, Vass WC, Lowy DR, Schiller JT. NHPV16 VLP vaccine induces human antibodies that neutralize divergent variants of HPV16 **Virology** 2001; 279:361-9.

Rajeevan MS, Swan DC, Nisenbaum R, et al. Epidemiologic and viral factors associated with cervical neoplasia in HPV-16-positive women. **Int J Cancer** 2005 Feb 1; [Epub ahead of print]

Richardson H, Kelsall G, Tellier P, et al. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2003; 12:485-90.

Roden RB, Greenstone HL, Kirnbauer R, et al. In vitro generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype. **J Virol** 1996a; 70:5875-83.

Roden RB, Hubbert NL, Kirnbauer R, Christensen ND, Lowy DR, Schiller JT. Assessment of the serological relatedness of genital human papillomaviruses by hemagglutination inhibition. **J Virol** 1996b; 70:3298-301.

Rousseau MC, Franco EL, Villa LL, et al. A cumulative case-control study of risk factor profiles for oncogenic and nononcogenic cervical human papillomavirus infections **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2000; 9:469-76.

Sambrook J, Russel DW. **Molecular cloning a laboratory manual**. 3rd Philadelphia: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1999. Plasmids and their usefulness in Molecular Cloning. Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with SDS: Maxiprep. p.:1.38-1.42.

Sambrook J, Russel DW. **Molecular cloning a laboratory manual**. 3rd Philadelphia: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1999. Purification of Closed Circular DNA by Equilibrium Centrifugation in CsCl Ethidium Bromide Gradients: Continuous Gradients. p.: 1.65-1.68.

Sarian LO, Derchain SF, Pitta Dda R, Morais SS, Rabelo-Santos SH. Factors associated with HPV persistence after treatment for high-grade cervical intra-epithelial neoplasia with large loop excision of the transformation zone (LLETZ). **J Clin Virol** 2004; 31:270-4.

Sasagawa T, Pushko P, Steers G, et al. Synthesis and assembly of virus-like particles of human papillomaviruses type 16 in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Virology** 1995; 206:126-35.

Sasagawa T, Inoue M, Lehtinen M, et al. Serological responses to human papillomavirus type 6 and 16 virus-like particles in patients with cervical neoplastic lesions. **Clin Diagn Lab Immunol** 1996; 3:403-10.

Sasagawa T, Yamazaki H, Dong YZ, Satake S, Tateno M, Inoue M. Immunoglobulin-A and -G responses against virus like particles (VLP) of human papillomavirus type 16 in women with cervical cancer and cervical intraepithelial lesions. **Int J Cancer** 1998; 75: 529-35.

Schiffman M, Kjaer SK. Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. **J Natl Cancer Inst Monogr** 2003;31:14-9.

Schiller JT, Roden RBS. **Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomavirus**. Leeds: Leeds University Press; 1996. Papillomavirus-Like Particles: Basic and Applied Studies. p.: 101-111.

Schlecht NF, Trevisan A, Duarte-Franco E, et al. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. **Int J Cancer** 2003; 103:519-24.

Silva IS. **Cancer Epidemiology: Principles and Methods**. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1999. Measurements of exposures and outcomes; p.11-34.

Strickler HD, Kirk GD, Figueroa JP, et al. A HPV-16 antibody prevalence in Jamaica and the United States reflects differences in cervical cancer rates. **Int J Cancer** 1999; 80:339-44.

Studentsov YY, Schiffman M, Strickler HD, et al. Enhanced enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to virus-like particles of human papillomavirus. **J Clin Microbiol** 2002; 40:1755-60.

Sun Y, Eluf-Neto J, Bosch FX, et al. Serum antibodies to human papillomavirus 16 proteins in women from Brazil with invasive cervical carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1999; 8:935-40.

Syrjanen S, Shabalova I, Petrovichev N, et al. Acquisition of high-risk human papillomavirus infections and pap smear abnormalities among women in the New Independent States of the Former Soviet Union. **J Clin Microbiol** 2004; 42:505-11.

Thomann P, Candeias JMG, Trevisan A, Rohan T, Villa LL, Franco EL. Serological reactivity to capsid antigens of HPV-16 and the occurrence of HPV infection of low and high viral load in the Ludwig-McGill cohort study. In:

Proceedings of the XIX International Papillomavirus Conference; 2001
Sep 1-7; Florianópolis, SC.

Tobery TW, Smith JF, Kuklin N, et al. Effect of vaccine delivery system on the induction of HPV16L1-specific humoral and cell-mediated immune responses in immunized rhesus macaques. **Vaccine** 2003; 21:1539-47.

Unckell F, Streeck RE, Sapp M. Generation and neutralization of pseudovirions of human papillomavirus type 33. **J Virol.** 1997, 71:2934-9.

van Doornum G, Prins M, Andersson-Ellstrom A, Dillner J. Immunoglobulin A G and M responses to L1 and L2 capsids of human papillomavirus types 6 11 16 18 and 33 L1 after newly acquired infection. **Sex Transm Infect** 1998; 74:354-60.

van Doornum GJ, Prins M, Pronk L, Coutinho RA, Dillner J. A prospective study of antibody responses to defined epitopes of human papillomavirus (HPV) type 16 in relationship to genital and anorectal presence of HPV DNA. **Clin Diagn Lab Immunol** 1994; 1:633-9.

van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, et al. **Virus taxonomy: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Virus.** New York: Academic Press; 1999.

Villa LL. Human papillomavirus and cervical cancer. **Adv Cancer Res** 1997; 71:321-42.

Villa LL, Sichero L, Rahal P, et al. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. **J Gen Virol** 2000; 81:2959-68.

Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol** 1999; 189:12-9.

Wang Z, Konya J, Avall-Lundkvist E, Sapp M, Dillner J, Dillner L. Human papillomavirus antibody responses among patients with incident cervical carcinoma. **J Med Virol** 1997; 52:436-40.

Wideroff L, Schiffman MH, Nonnenmacher B, et al. Evaluation of seroreactivity to human papillomavirus type 16 virus-like particles in an incident case-control study of cervical neoplasia. **J Infect Dis** 1995; 172:1425-30.

Yeager MD, Aste-Amezaga M, Brown DR, et al. Neutralization of human papillomavirus (HPV) pseudovirions: a novel and efficient approach to detect and characterize HPV neutralizing antibodies. **Virology** 2000; 278:570-7.

Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson A, et al. Smoking and oral contraceptives as risks factors for cervical carcinoma in situ. **Int J Cancer** 1999; 81:357-65.

Zhou J, Frazer IH. Papovaviridae: capsid structure and capsid protein function. In: Lacey C, editor. **Papillomavirus reviews: current research on papillomavirus**. Leeds: Leeds University Press; 1996. p.93-100.

Zolotukhin S, Potter M, Hauswirth WW, et al. A "humanized" green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells. **J Virol** 1996, 70:4646-54.

zur Hausen H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. **Biochim Biophys Acta** 1996a; 1288:55-78.

zur Hausen H. Viruses in human tumors: reminiscences and perspectives.
Adv Cancer Res 1996b; 68:1-22.