



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

ARTHUR HIPÓLITO PEREIRA LEITE

**GENOTIPAGEM PARA O HPV EM PACIENTES COM
NEOPLASIAS INTRAEPITELIAIS ANAIS**

Recife

2018

ARTHUR HIPÓLITO PEREIRA LEITE

**GENOTIPAGEM PARA O HPV EM PACIENTES COM NEOPLASIAS
INTRAEPITELIAIS ANAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, como requisito para a obtenção do título de mestre em Patologia.

Orientador: Mario Ribeiro de Melo-Junior

Co-orientadora: Maria Julliana Galvão Nunes

**Recife
2018**

Catálogo na fonte:
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

L533g Leite, Arthur Hipólito Pereira.
 Genotipagem para o HPV em pacientes com neoplasias intraepiteliais
 anais / Arthur Hipólito Pereira Leite. – Recife: o autor, 2018.
 64 f.; il.; 30 cm.

 Orientador: Mário Ribeiro Melo Júnior.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro
 de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Patologia.
 Inclui referências, apêndices e anexos.

 1 Neoplasias do ânus. 2. Técnicas de genotipagem. 3. Comportamento
 sexual. I. Melo Júnior, Mário Ribeiro (orientador). II. Título.

616.07 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2018 - 165)



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Centro de Ciências da Saúde - UFPE

Av. Prof. Moraes Rêgo 1235 - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE

Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo

Fone/Fax: (81) 2126.8529

<http://www.ppgpatologiaufpe.com>

**DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA**

AUTOR: ARTHUR HIPÓLITO PEREIRA LEITE

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA

**NOME DA DISSERTAÇÃO: “GENOTIPAGEM PARA O HPV EM PACIENTES COM NEOPLASIAS
INTRAEPITELIAIS ANAIS”.**

ORIENTADOR: PROF. DR. MARIO RIBEIRO DE MELO-JUNIOR

DATA DA DEFESA: 28 DE FEVEREIRO DE 2018

APROVADO: 28 DE FEVEREIRO DE 2018

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Lucas André Cavalcante Brandão

Prof. Dra. Adriana Maria da Silva Telles

Prof. Dra. Maria Julliana Galvão Nunes

RESUMO

A incidência do câncer anal vem aumentando atualmente, com um comportamento mais agressivo. A neoplasia intraepitelial anal é a lesão precursora, cujo início e progressão estão relacionados à infecção persistente pelo *Papillomavirus humano* (HPV). Assim, este trabalho objetivou avaliar a relação entre a infecção pelo HPV e as neoplasias intraepiteliais anais em mulheres atendidas em dois hospitais públicos da cidade do Recife. Este trabalho foi um estudo observacional descritivo, com tratamento quantitativo e qualitativo. Foi realizada coleta de material anal em 95 mulheres com diagnóstico prévio de lesão intraepitelial cervical. Os espécimes obtidos por escovado anal foram submetidos à técnica de *PCR*, para identificação do DNA do HPV e posterior genotipagem. O material obtido por biópsia foi processado para análises histopatológicas. Além dos testes laboratoriais, foram aplicados questionários individuais que permitiram caracterizar hábitos comportamentais das participantes. Os dados obtidos foram tratados por métodos estatísticos, considerando-se significativo $p > 0.05$. As análises histopatológicas demonstraram lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL) em 43% das pacientes e lesão intraepitelial de alto grau (HSIL) em 22% das mulheres analisadas. Os métodos moleculares identificaram 70% de positividade para o HPV, sendo o subtipo viral não-oncogênico do tipo 6 o mais prevalente (22,5%), principalmente nas amostras que apresentaram lesões intraepiteliais. Em relação aos hábitos comportamentais, 26,3% referiram o hábito de fumar e 43% relataram ingerir bebida alcoólica. Observamos também que 70,5% das mulheres estudadas realizavam sexo anal, sendo 93,7% destas sem uso de preservativos. Os resultados obtidos demonstraram uma prevalência significativa de lesões intraepiteliais anais, associadas ao HPV. Esses fatores, combinados com comportamentos sexuais de risco, contribuem para o desenvolvimento e progressão dessas lesões, que podem evoluir para o câncer do canal anal.

Palavras-chave: Neoplasias do ânus. Técnicas de genotipagem. Comportamento sexual.

ABSTRACT

The incidence of anal cancer has been increasing, with a more aggressive behavior. Anal intraepithelial neoplasia is a precursor lesion whose onset and progression are related to infection and persistence of human Papillomavirus (HPV). Thus, this study aimed to evaluate the relationship between HPV infection and anal intraepithelial neoplasia in women treated at two public hospitals in the city of Recife. It is a descriptive observational study, with quantitative and qualitative treatment. A collection of anal material was performed in 95 women with previous diagnosis of cervical intraepithelial lesion. The specimens obtained by anal brushing were submitted to the PCR technique for identification of HPV DNA and subsequent genotyping. The material obtained by biopsy was processed for histopathological analysis. In addition to the laboratory tests, individual questionnaires were used to characterize the behavioral habits of the participants. The data obtained were treated by statistical methods, considering $p > 0.05$ as significant. Histopathological analyzes demonstrated low-grade intraepithelial lesion (LSIL) in 41 patients and high-grade intraepithelial lesion (HSIL) in 21 women. Genotyping methods identified HPV 6 as the most prevalent subtype, followed by HPV 33, HPV 31, HPV 16 and HPV 18. The results showed a significant prevalence of anal intraepithelial lesions, associated with HPV. These factors, combined with risky sexual behaviors, contribute to the development and progression of these lesions, which can progress to cancer of the anal canal.

Abstract: Anus neoplasms. Genotyping techniques. Sexual behavior.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Anatomia do canal anal.....	13
Figura 2. Progressão das lesões intraepiteliais escamosas.....	14
Figura 3. Genoma do HPV.....	18
Figura 4. Citologia convencional do canal anal.....	22
Figura 5. Amplificação de DNA alvo pela PCR.....	25

ARTIGO ORIGINAL

Figura 1. Relação entre os fatores de risco e o tipo de HPV identificado por genotipagem em mucosa anal.....	37
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Primers</i> específicos.....	29
--	----

ARTIGO ORIGINAL

Tabela 1. <i>Primers</i> específicos.....	34
--	----

Tabela 2. Aspectos clínico-epidemiológicos de biópsias anais de pacientes atendidos em Recife (PE) entre os anos de 2014 e 2016.....	35
---	----

Tabela 3. Frequência de infecção por HPV associada aos tipos de lesão intraepitelial anal.....	36
---	----

PRINCIPAIS ABREVIATURAS E SIGLAS

APC Célula Apresentadora de Antígeno
DC Célula Dendrítica
DNA Ácido Desoxirribonucleico
dNTP Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
E1, E2, E4, E5, E6 e E7 Proteínas Virais Precoces
E2F Fator de Transcrição E2F
HIV Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV Papiloma Vírus Humano
HRA Anuscopia de Alta Resolução
HSIL Lesão Intraepitelial de Alto grau
JEC Junção Escamocolumnar
L1 e L2 Proteínas Tardias do HPV Codificantes do Capsídeo Viral
LC Célula de Langerhans
LCR Região de Controle Longo
LIKA Laboratório de Immunopatologia Keizo Asami
LSIL Lesão Intraepitelial de Baixo Grau
MHC Complexo Principal de Histocompatibilidade
MY09/11 Primers Específicos para Identificação do HPV
NIA Neoplasia Intraepitelial Anal
NIC Neoplasia Intraepitelial Cervical
NK Célula Natural Killer
ORF Fases de Leitura Aberta
p53 Proteína de massa de 53 kda, Supressora de Tumor
pb Pares de Bases
PCR Reação em Cadeia da Polimerase
pRB Proteína do Retinoblastoma
qPCR Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
TLR Receptores do Tipo Toll
TNF Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2. 1 ANATOMIA ANAL	12
2. 2 NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ANAL	13
2. 3 CÂNCER ANAL	15
2. 4 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER ANAL	16
2. 5 FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER ANAL	17
2. 5. 1 <i>Papillomavirus humano</i>	17
2. 5. 1. 1 Classificação viral	18
2. 5. 1. 2 Mecanismos de infecção e transformação celular	19
2. 5. 1. 3 Resposta imunológica à infecção pelo HPV	20
2. 6 RASTREIO DO CARCINOMA ANAL E SEUS PRECURSORES	21
2. 6. 1 <i>Citologia anal</i>	22
2. 6. 2 <i>Anuscopia de alta resolução e biópsia dirigida</i>	23
2. 6. 3 <i>Testes auxiliares</i>	24
2. 6. 3. 1 Testes moleculares	24
3 OBJETIVOS	26
3. 1 OBJETIVO GERAL	26
3. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4 METODOLOGIA	27
4. 1 TIPO DE ESTUDO	27
4. 2 POPULAÇÃO E AMOSTRAGEM	27
4. 3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	27
4. 4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	27
4. 5 COLETA DE DADOS	28
4. 6 ANÁLISE MOLECULAR	28
4. 6. 1 <i>Extração de ácidos nucléicos</i>	28
4. 6. 2 <i>Deteção de DNA do HPV</i>	29
4. 7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
4. 8 ASPECTOS ÉTICOS	30
5 GENOTIPAGEM PARA O HPV EM PACIENTES COM NEOPLASIAS INTRAEPITELIAIS ANAIS	31
6 CONCLUSÕES	44

REFERÊNCIAS	45
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	53
APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO	54
ANEXO A - PROTOCOLO DO COMITÊ DE ÉTICA	56
ANEXO B – INSTRUÇÕES PARA AUTORES	59

1 INTRODUÇÃO

O câncer anal são tumores que ocorrem no canal e bordas externas do ânus. Apresenta-se como uma neoplasia de baixa incidência, representando de 1 a 2% de todos os tumores do cólon, sendo o carcinoma epidermóide responsável por 85% dos casos (INCA, 2016). Atualmente, a incidência dessa doença vem aumentando, muitas vezes com um comportamento mais agressivo e de difícil resposta ao tratamento (NELSON; BERSON, 2017).

A American Cancer Society estimou para o ano de 2017 cerca de 8.200 novos casos de câncer anal (5.250 em mulheres e 2.950 em homens) nos Estados Unidos, com uma estimativa de 1.100 mortes, dentre as quais 650 relacionadas ao sexo feminino (SIEGEL et al., 2017). No Brasil, de acordo com o último levantamento de dados realizado pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), o número de óbitos, em 2013, foi de aproximadamente 348, sendo 106 homens e 242 mulheres (INCA, 2016).

O câncer anal apresenta como estágio precedente a neoplasia escamosa intraepitelial (NIA) (BERRY et al., 2014), possuindo como fatores de risco a infecção persistente pelo *Human Papillomavirus* (HPV), imunossupressão, comportamento sexual de risco, tabagismo e outras infecções associadas ao HPV, como câncer de colo de útero, vagina e vulva (STIER et al., 2015; MOSCICKIN et al., 2015).

O HPV pertence a um grupo de vírus de DNA, normalmente transmitidos pelo contato sexual. Eles podem infectar as regiões anogenitais, boca e garganta de homens e mulheres (DOOBAR et al., 2015). Mais de 200 tipos de HPV são descritos, dos quais, pelo menos, treze são considerados de alto risco para o desenvolvimento de neoplasias (SPIESS et al., 2016).

Grande parte das infecções por HPV são transitórias e se resolvem espontaneamente pelo sistema imune, não necessitando de tratamento. Entretanto, em um número pequeno, porém significativo de indivíduos, a infecção se torna persistente, permanecendo latente por tempo variável, sendo posteriormente reativada, podendo resultar em lesões precursoras de diferentes graus, as quais podem progredir para o câncer (BERNARDI et al., 2015; VAN et al., 2016).

A aplicação de técnicas de rastreio contribui para a redução dos casos de câncer anal, através da detecção de lesões pré-malignas. Essas técnicas incluem a citologia anal e a anuscopia de alta resolução. O rastreamento tem sido proposto

para os grupos de maior risco como homens que praticam sexo com homens, pacientes HIV positivos, pacientes transplantados em uso de imunossupressores e mulheres com neoplasia intraepitelial ou câncer do colo de útero, vagina e vulva (CUMING e NATHAN, 2017).

Além disso, os métodos de biologia molecular também merecem importância, por possibilitarem a identificação de genótipos de alto risco oncogênico, que estão intimamente relacionados à etiologia das lesões intraepiteliais do trato anogenital, particularmente os subtipos 16 e 18 (BENEVOLO et al., 2016).

Tendo em vista o crescente aumento dos casos de lesões intraepiteliais anais e dos cânceres anais, o presente estudo objetivou avaliar os fatores de risco associados a essa neoplasia, em mulheres que apresentavam lesões intraepiteliais cervicais. Para estes fins, foi feita uma análise do perfil comportamental das mulheres estudadas e avaliação da prevalência da infecção anal pelo HPV, fator esse intimamente relacionado ao desenvolvimento dos tumores anais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2. 1 ANATOMIA ANAL

O canal anal representa a porção final do intestino grosso, apresentando aproximadamente 2,5 a 3,5 cm de comprimento. Inicia-se na junção anorretal (zona de transição) e se estende até a margem anal (ânus), representando a abertura inferior do tubo digestivo. É revestido por uma fina camada muscular, que na extremidade superior do canal forma o esfíncter interno, constituído por músculo liso, e na extremidade inferior apresenta o esfíncter externo, formado por musculatura esquelética (SHRIDHAR et al., 2015).

O revestimento mucoso é constituído por epitélio glandular, transicional e escamoso não queratinizado. A parte superior do canal é revestida por um epitélio glandular semelhante ao reto, a região inferior é revestida por epitélio escamoso que se assemelha a pele da região perianal e próximo a essa região encontra-se a zona de transformação, que possui um epitélio escamoso metaplásico, de extensão variável, exibindo um epitélio transicional. O limite da zona de transformação é a junção escamocolunar (JEC), que corresponde a área onde o epitélio glandular retal encontra o epitélio escamoso do canal anal. Essa região é formada por células em metaplasia (BARRAGH, 2017).

Entre as regiões superiores e inferiores do canal anal, encontram-se as colunas anais, as quais reúnem-se, por uma prega da mucosa, às válvulas anais. A linha pectínea, importante ponto anatômico, é formada pelas válvulas anais e as bases das colunas anais. A região inferior estende-se da linha pectínea até a margem anal. Distalmente, a mucosa escamosa se mistura com a pele perianal. Esta junção mucocutânea é denominada margem anal (WANG, et al., 2015) (Figura 1).

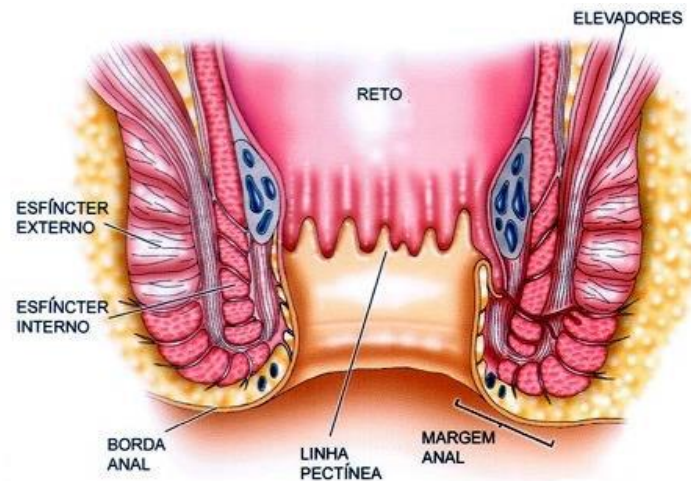


Figura 1: Anatomia do Canal Anal. Fonte: endoclin.med.br

2. 2 NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ANAL

A neoplasia intraepitelial anal é uma lesão precursora do carcinoma escamoso anal (JIN et al., 2017). O epitélio displásico é caracterizado pela presença de graus progressivos de anomalias de diferenciação celular e de maturação, ocorridas desde a membrana basal até a superfície epitelial (ABRAMOWIT et al., 2007).

Podem ser classificadas em três categorias ascendentes, de acordo com seu reconhecido potencial para a transformação maligna: Neoplasia Intraepitelial Anal de Grau I (NIA I), que apresenta anormalidades nucleares limitadas ao terço inferior do epitélio, Neoplasia Intraepitelial Anal de Grau II (NIA II) e Neoplasia Intraepitelial Anal de Grau III (NIA III), que apresentam alto grau de displasia envolvendo os dois terços inferiores e espessura total do epitélio, respectivamente. (SIEGENBEEK et al., 2017).

Em virtude do considerável grau de discordância inter e intraobservadores, na análise diagnóstica de lesões intraepiteliais, (CAI et al., 2007), a tendência atual é a de condensar a classificação trina original (NIA-I, NIA-II, NIA-III) na binária proposta pelo Consenso de Bethesda, de 2001 (CEBALLOS et al., 2008). Sendo assim, a NIA-I tem sido denominada Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL), enquanto que NIA-II e NIA-III formam uma única categoria, denominada Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL) (MIN et al., 2017).

As lesões anais de alto grau são consideradas lesões pré-malignas e podem progredir para o carcinoma *in situ* ou carcinoma escamoso invasivo, quando ocorre infiltração da lâmina própria por aglomerados de células tumorais (DARRAGH, 2017) (Figura 2).

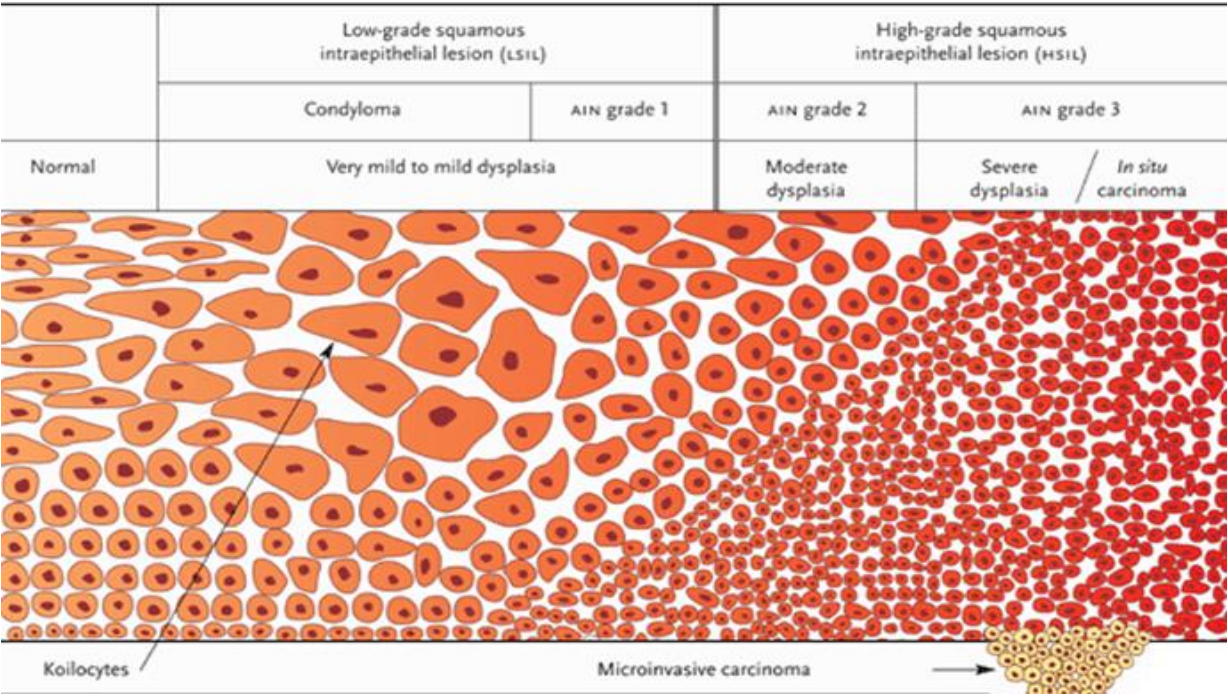


Figura 2: Progressão das lesões intraepiteliais escamosas. Classificação por métodos citológicos e histopatológicos, onde a sigla AIN reflete a Neoplasia Intraepitelial Anal. Também é demonstrada a classificação baseada na nomenclatura de Bethesda: Lesão Intraepitelial Escamosa de baixo Grau (LSIL) e Lesão Intraepitelial Escmosa de Alto Grau (HSIL). Fonte: Adaptado de Brickman, C. e Palefsky, J. M. (2015).

2. 3 CÂNCER ANAL

Os tumores anais podem ocorrer na borda anal ou no canal anal, até a transição com o reto. Os tumores que surgem na borda anal são lesões dermatológicas e, como tal, podem ser tratados apenas com excisão local. Por outro lado, os tumores que surgem no canal anal ou na zona de transição entre este e o reto podem apresentar-se como adenocarcinoma ou carcinoma escamoso, requerendo tratamentos mais agressivos (FLÉJOU, 2015).

Cerca de 80% dos tumores malignos anais são carcinomas de células escamosas. Os tumores que surgem na porção distal à linha pectínea são frequentemente mais queratinizados, em relação aos que aparecem acima da linha pectínea. O adenocarcinoma do ânus constitui apenas 5 a 10% dos casos, porém se comporta e é tratado como câncer retal. Outros cânceres também são categorizados como câncer anal devido sua localização; estes incluem carcinomas cloacogênicos, desenvolvidos na zona de transição; carcinomas basocelulares, derivados a partir da pele na área perianal; e melanoma maligno, que pode se manifestar na pele ou mucosa anal (FLÉJOU, 2015).

As manifestações clínicas do câncer anal são frequentemente tardias e estão relacionadas ao tamanho e extensão do tumor. Os sintomas são inespecíficos, sendo comum sangramento retal, prurido e desconforto anal. Outros sintomas incluem fezes de calibre fino, alterações nos movimentos intestinais, tenesmo não aliviado pela evacuação e sensação de uma massa no canal anal. Dor durante a defecação, corrimento anal ou mudança de hábitos intestinais são geralmente encontrados em casos mais avançados.

De 70 a 80% dos casos de câncer anal são inicialmente diagnosticados como condições benignas, como doença de Paget, leucoplasia, hemorroidas, fissuras e fístulas; e 20% dos pacientes não apresentam sintomas ao diagnóstico. Por estas razões, a maioria dos pacientes apresenta doença avançada ao diagnóstico (TUPE e PHAM, 2016).

2. 4 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER ANAL

Os tumores malignos do canal anal representam menos de 0,5% de todos os tipos de câncer e 2% dos tumores do trato digestivo. No geral o tipo mais prevalente é o carcinoma de células escamosas (85%), seguido por adenocarcinoma (10%). Outros subtipos histológicos raros incluem melanoma, tumor neuroendócrino, carcinoide, sarcoma, tumor estromal gastrointestinal e linfoma, representando menos de 5% de todos os tumores diagnosticados no canal anal (FLEJOU, 2015; SHRIDHAR et al., 2015).

A incidência do câncer anal aumentou 50% nos últimos 30 anos, com incidência anual de 2:100.000 pessoas na população em geral (TONG et al., 2014; ISLAMI et al., 2016). Grande parte das informações epidemiológicas refere-se ao carcinoma de células escamosas. Assim, de acordo com as estatísticas, esse tipo de tumor é mais prevalente em mulheres, com o risco aumentando de acordo com a idade (a idade média de diagnóstico é de 60 anos), e quando ocorre em jovens, muitas vezes esses pacientes são imunocomprometidos. Com tudo, o diagnóstico em pessoas cada vez mais jovens vem sendo notificado atualmente (TONG et al., 2014; FLEJOU, 2015).

A incidência do câncer do canal anal em indivíduos mais jovens está relacionada a dois fatores principais. Primeiro, ao uso da terapia com medicamentos antirretrovirais, que resulta em uma sobrevida maior dos indivíduos infectados pelo HIV, o qual eleva o risco de câncer anal ao longo do tempo. Segundo, um aumento de práticas sexuais de risco (multiplicidade de parceiros sexuais, não uso de preservativos, sexo anal receptivo e o coito anal), o que resulta no aumento das taxas de infecção pelo vírus HPV (NELSON et al., 2013; STIER et al., 2015).

Estudos anteriores demonstraram aumento do número de câncer anal em diversos países, como o Canadá, a França e o Reino Unido (BOUVIER et al., 2016; ISLAMI et al., 2016). Nos EUA, estimou-se para o ano de 2017 aproximadamente 8.200 novos casos, sendo esperadas 1.100 mortes (SIEGEL et al., 2017). No Brasil, a estimativa para o ano de 2016, válida também para o ano de 2017, aponta a ocorrência de aproximadamente 34 mil casos de câncer de cólon, reto e/ou ânus (INCA, 2015).

2. 5 FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER ANAL

Os principais fatores de risco conhecidos para o câncer anal incluem a infecção persistente pelo HPV, imunossupressão (pacientes HIV positivos e transplantados de órgãos que utilizam drogas imunossupressoras), comportamento sexual de risco (história de intercurso anal receptivo, número elevado de parceiros sexuais, presença de outras doenças sexualmente transmissíveis), tabagismo e outras afecções associadas ao HPV, como história de neoplasia intraepitelial ou câncer de colo de útero, vagina ou vulva (WELTON; SHARKEY; KAHLENBERG, 2004; CHAVES et al., 2011).

Além desses fatores, portadores de lesões anais crônicas benignas que cursam com inflamação (hemorroidas, fístulas, fissuras anais), usuários de drogas injetáveis e influência de fatores genéticos são outros fatores que impõe risco para o acometimento de câncer em epitélio anal (SILVA et al., 2005).

2. 5. 1 *Papillomavirus humano*

O HPV pertence à família *Papillomaviridae* e gênero *Papillomavirus*. São vírus que apresentam tropismo por células epiteliais, causando infecções na pele e nas mucosas (genital, anal, oral, laringe e esôfago), e sua replicação ocorre no núcleo das células escamosas epiteliais (TORRE et al., 2015).

Apresenta-se como um vírus não envelopado de simetria icosaédrica, com capsídeo composto por 72 capsômeros. Seu genoma é formado por DNA dupla fita e circular, contendo cerca de 8.000 pares de bases (GARCÍA-ESPINOSA et al., 2009; WALHART, 2015).

O genoma do HPV divide-se em três regiões: região tardia (L), região precoce (E) e região reguladora (LCR). A região tardia possui genes estruturais (L1 e L2) envolvidos na estrutura do capsídeo. A região precoce possui genes relacionados ao processo de replicação viral (E1-E7), onde são distribuídos nas seguintes funções: replicação viral (E1, E2), regulação da expressão (E2), montagem e liberação do vírus (E4) e imortalização e transformação celular (E5, E6 e E7). A região reguladora não-codificante (LCR) contém a sequência de origem de replicação (ORI) e a maioria dos promotores de transcrição (figura 2) (BORDIGNON, et al., 2017).

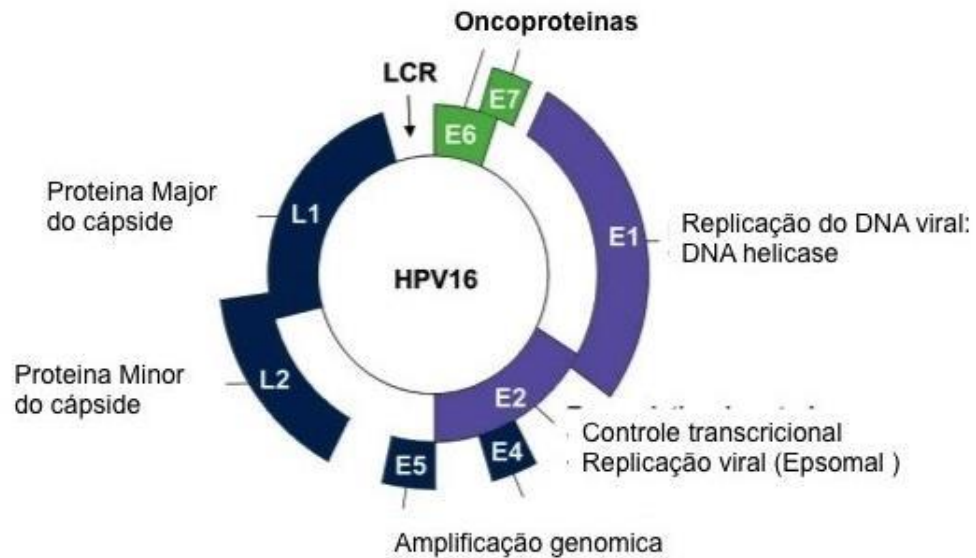


Figura 3: Genoma do HPV. DNA circular de dupla-fita, com a localização dos genes. Fonte: Adaptado de D'Abramo CM, Archambault J. (2011).

2. 5. 1. 1 Classificação viral

Diferente de outros grupos virais, os papilomavírus não são referidos por sorotipos. Sua classificação em tipos distintos se baseia na espécie de origem e no grau de relação dos genomas virais, mediante a comparação da sequência de nucleotídeos do seu genoma viral (HAZARD, 2007).

São agrupados em diferentes gêneros que, por sua vez, são divididos em diferentes espécies contendo um ou mais genótipos. Cada genótipo é agrupado em subtipos e variantes de acordo com a similaridade da sequência na região L1 (DE VILLIERS, 2004).

São conhecidos cerca de 200 genótipos do HPV, dos quais aproximadamente 40 podem infectar a região anogenital, sendo classificados em baixo-risco (não-oncogênico) e alto-risco (oncogênico) de acordo com o grau de malignidade que provocam na região infectada (SPIESS et al., 2016).

Dentre os genótipos de baixo risco estão incluídos o HPV 6, 11, 40, 42, 43 e 44, que podem causar lesões benignas genitais e verrugas na pele. Já entre os de alto risco podemos citar os tipos 16, 18, 31, 33, 53, 56, entre outros, destacando-se

os tipos 16 e 18 como os mais associados ao desenvolvimento de lesões intraepiteliais anais de alto grau e carcinoma invasor. O tipo viral mais encontrado nos casos de câncer anal é o 16, bem como no de colo de útero. (HOOTS et al., 2009).

2. 5. 1. 2 Mecanismos de infecção e transformação celular

A infecção pelo HPV é o principal fator de risco para o desenvolvimento de tumores do canal anal. Este vírus é capaz de promover lesões que, caso não sejam tratadas, podem progredir para o carcinoma invasivo. O HPV está presente em 80 a 90% dos pacientes com carcinoma anal de células escamosas, sendo o HPV 16 o tipo mais associado ao câncer anal, presente em 65 a 80% dos casos, seguido pelo HPV 18. Esses dois tipos, sozinhos ou em associação, são encontrados em 78% de todos os cânceres anais (BRICKMAN e PALEFSKY, 2015).

A transmissão do HPV ocorre na maioria das vezes por via sexual. O HPV acessa os queratinócitos basais do epitélio anal por meio da zona de transformação. Após a entrada do vírus na célula, o genoma se estabiliza na forma de elementos extra cromossômicos no núcleo. Nesta fase, há replicação do material genético celular e viral e, ao se dividirem, essas células infectadas distribuem equitativamente o DNA viral entre as células filhas. Algumas das células suprabasais infectadas pelo HPV iniciam o programa de diferenciação celular, porém outras continuam proliferando na camada basal. Este processo é seguido pela síntese das proteínas do capsídeo, montagem do vírion e liberação da partícula viral (BRICKMAN E PALEFSKY, 2015).

Nas lesões benignas, o DNA do HPV é identificado em estado epissomal, enquanto na maioria das lesões de alto grau, o genoma se encontra integrado ao genoma do hospedeiro. A integração do DNA viral ocorre em razão da clivagem em região específica dos genes E1/E2 na maior parte dos casos. O gene E2 atua no controle da transcrição e replicação, e entre outras funções, inibe a transcrição dos oncogenes E6 e E7. Como consequência da clivagem e perda do controle transcricional exercido pela proteína E2, há superexpressão das oncoproteína de E6 e E7 do HPV, responsáveis pelo início e manutenção do processo carcinogênico (MOODY e LAIMINS, 2010).

A proteína 53 (p53), envolvida nas vias de reparo ao dano do DNA, por levar à interrupção do ciclo celular na fase G1 ou induzir a apoptose, forma complexo com a proteína E6, resultando na sua degradação e inativação. Já a proteína E7 do HPV forma complexos com a proteína do retinoblastoma (pRB). Em condições normais, a pRB está complexada ao fator de transcrição celular E2F na fase G1 do ciclo celular. Para entrar na fase S, a pRB é fosforilada, o que leva à liberação do fator de transcrição E2F e progressão do ciclo celular. A inativação da pRB pela proteína viral E7 causa a liberação do fator de transcrição E2F, que passa a ser ativo em todas as fases do ciclo celular, levando ao crescimento celular desordenado das células tumorais HPV-positivas. A ação combinada das proteínas E6 e E7 resulta na anulação de muitos pontos de checagem do ciclo celular, o que, em células persistentemente infectadas com HPV, leva ao acúmulo de mutações celulares ao longo do tempo e consequente progressão para câncer (ZAPIEN et al., 2016).

2. 5. 1. 3 Resposta imunológica à infecção pelo HPV

Os HPVs induzem infecções crônicas que normalmente não apresentam manifestações clínicas sistêmicas. São agentes infecciosos bem sucedidos, os quais evoluíram para evitar ao máximo a sua exposição ao sistema imune do hospedeiro. No entanto, o sistema imunológico tem um papel importante no controle das infecções pelo HPV (SASAGAWA et al., 2012).

Durante as fases iniciais de uma infecção por HPV, a resposta imune inata do hospedeiro torna-se a primeira linha de defesa contra a infecção. Macrófagos, células dendríticas (DCs), células de Langerhans (LCs), células natural killer (NK), neutrófilos e queratinócitos, reconhecem antígenos virais por meio de receptores do tipo Toll-like receptors (TLR), cuja sinalização ativa uma cascata de citocinas inflamatórias e quimiocinas como as interleucinas (ILs), o fator de necrose tumoral (TNF) e os interferons (IFN). Esses eventos visam o recrutamento de células imunes e a secreção de fatores antivirais, vinculando a imunidade inata com a imunidade adaptativa (AMADOR-MOLINA et al., 2013; DAI et al., 2017).

Após o reconhecimento de antígenos e a produção de citocinas inflamatórias, as DCs, que são células apresentadoras de antígenos (APCs) residentes principais, processam o antígeno viral e aumentam a expressão do complexo de

histocompatibilidade principal (MHC), para apresentar o antígeno processado aos linfócitos T. Após a sua ativação, as células T podem se diferenciar em linfócitos TCD4+, contribuindo com uma resposta mediada por células ou com resposta humoral. Por outro lado, a diferenciação em células TCD8+ gera linfócitos T citotóxicos capazes de reconhecer e eliminar células infectadas mediante secreção de enzimas proteolíticas (PAI, 2013; DAI et al., 2017).

Contudo, algumas infecções por HPV não são rapidamente eliminadas pela imunidade da mucosa. De fato, a expressão crônica de HPV, a baixos níveis, pode induzir tolerância ao epitélio infectado. Existem várias razões para isto, que estão diretamente ligadas ao ciclo de vida do vírus. Primeiro, o vírus não tem uma fase de disseminação sanguínea; segundo, não causa lise dos queratinócitos, e, portanto não induz resposta inflamatória; e terceiro, a produção e liberação do vírus se dá nas células escamosas diferenciadas que são distantes das citocinas e células imunocompetentes na submucosa (BASHAW, et al., 2017; BORDIGNON, et al., 2017).

2. 6 RASTREIO DO CARCINOMA ANAL E SEUS PRECURSORES

A prevenção e a detecção precoce do câncer anal ou de NIA têm importante papel na sobrevida dos pacientes. As técnicas atuais de detecção do câncer anal incluem a citologia anal, para detecção de lesões precoces; identificação dos tipos de HPV de alto risco; a anoscopia de alta resolução e a confirmação histopatológica (CUMING e NATHAN, 2017).

O rastreamento do câncer anal vem sendo discutido e incentivado nos grupos considerados de risco. As Diretrizes do Serviço de Saúde Pública dos EUA recomendam que a citologia anal deva ser considerada para homens e mulheres HIV positivos. O Instituto de AIDS do Estado de Nova York recomenda a realização anual do exame de toque retal para todos os pacientes HIV positivos, e do exame citológico anal para homens que praticam sexo com homens, pacientes com história de condilomas anais e mulheres com histologia vulvar ou de colo uterino anormal (ABERG et al., 2014).

2. 6. 1 Citologia anal

A citologia é uma ferramenta de rastreio de lesões anais, que permite a obtenção de células para análises citopatológicas, com a interpretação baseada no sistema de Bethesda (Figura 5). No entanto, como um teste de rastreio, não fornece diagnóstico definitivo, sendo usado principalmente para o acompanhamento do paciente (JAY, 2011; JOHNSON et al., 2015).

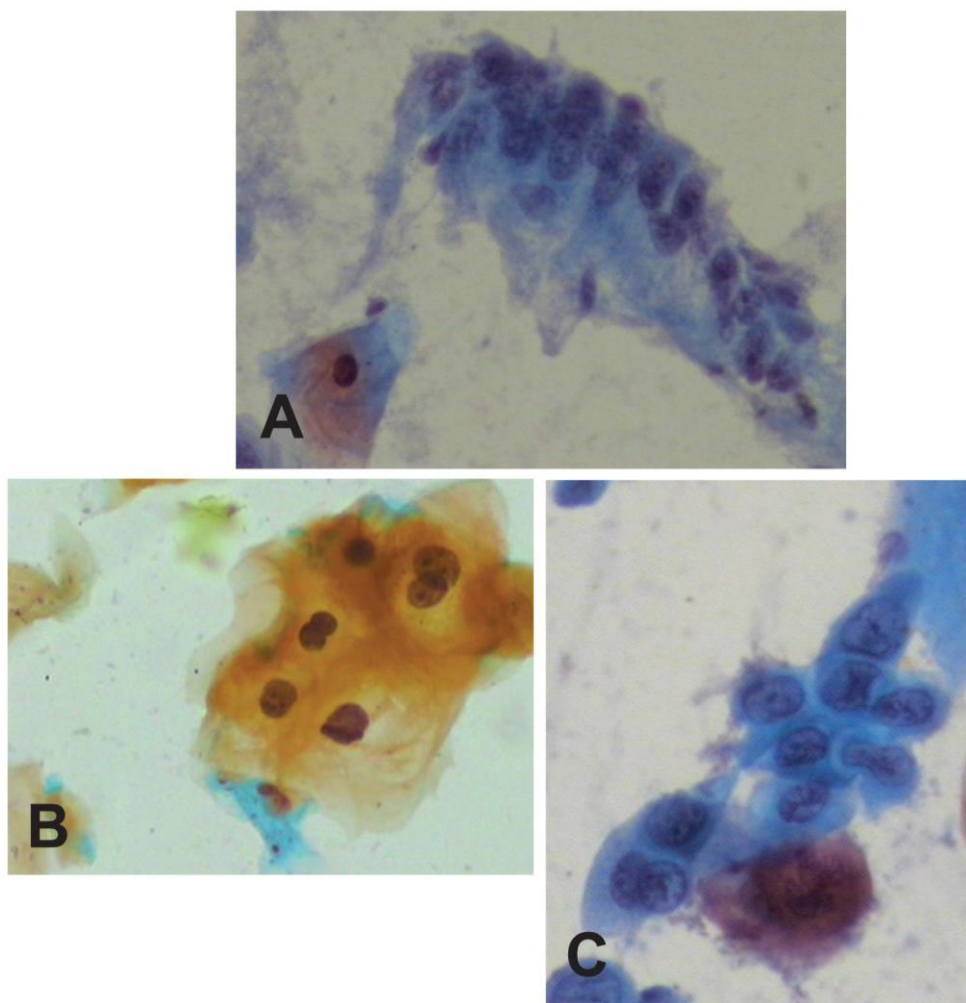


Figura 4: Citologia convencional do canal anal pelo método de Papanicolaou (400×). A - Células colunares anais normais; B - Lesão intraepitelial anal de baixo grau; C - Lesão intraepitelial anal de alto grau. Fonte: Barcellos et al., 2014.

Estudos sobre o uso da citologia anal demonstraram valores de sensibilidade e especificidade entre 42 a 98% e entre 16 a 96%, respectivamente. Porém, apesar de ser um método sensível, resultados citológicos podem não concordar bem com a histologia. Ao se interpretar tais resultados, deve-se levar em conta a subjetividade da histologia, também sujeita a erros de amostragem e medição (BEAN e CHHIENG, 2010; DUARTE et al., 2016).

Além disso, o sucesso do rastreio do câncer anal deve ser baseado na repetição dos testes ao longo do tempo. Palefsky et al relataram em seus estudos aumento na sensibilidade para a detecção de lesões anais, de 69% para 81%, após 2 anos de triagens subsequentes. Nos Estados Unidos, avaliou-se o custo-benefício da citologia anal no rastreamento de homens que fazem sexo com homens, portadores ou não do HIV, e verificou-se que a triagem a cada 2 ou 3 anos pode ser vantajosa e trazer benefícios à expectativa de vida dos pacientes (CUMING e NATHAN, 2017).

2. 6. 2 Anuscopia de alta resolução e biópsia dirigida

A anuscopia de alta resolução (HRA) baseia-se na utilização de um colposcópio com luz, equipado com uma lente magnificadora de imagens, que permite o estudo do epitélio de transição do canal anal. Semelhante à colposcopia cervical, para a análise do canal anal utiliza-se uma gaze embebida com ácido acético a 3-5% e uma coloração com lugol (ALBUQUERQUE et al., 2017).

A suspeita de NIA se dá mediante observação de placas acetobrancas, que não captam lugol, e regiões da mucosa que apresentem alterações vasculares. A anuscopia apresenta considerável subjetividade, com sensibilidade e especificidade variando de 59 a 100% e de 19 a 66%, respectivamente. Entretanto, resultados de anuscopia geralmente correlacionam bem com os histopatológicos (GIMENEZ et al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 2017).

Apesar de suas limitações, o exame histopatológico ainda é considerado o padrão-ouro para o diagnóstico de lesões anais. As NIA são geralmente diagnosticadas utilizando-se uma adaptação da classificação das Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NIC), sendo categorizadas histopatologicamente nos graus 1, 2 e 3, dependendo da avaliação qualitativa e quantitativa de: atipias citológicas,

grau de maturação e diferenciação do epitélio escamoso e atividade mitótica (MAIA et al., 2014).

Devido à alta prevalência de NIA em certas populações, e também ao fato de que um único resultado citológico negativo tem um valor preditivo negativo pobre em populações com alta prevalência de doença, alguns pesquisadores têm defendido o uso da HRA como um teste de rastreio primário. No entanto, dada a disponibilidade insuficiente de HRA, a utilização da citologia para fazer a triagem de indivíduos para HRA seguida de biópsia, pode ser a melhor abordagem atual para identificar a doença na população em situação de risco (LAM et al., 2011).

2. 6. 3 Testes auxiliares

2. 6. 3. 1 Testes moleculares

Diferentes métodos moleculares estão disponíveis para a determinação dos tipos de HPV presentes na mucosa anal infectada. Dentre essas técnicas pode-se destacar a reação em cadeia da polimerase (PCR), que amplifica o material genético (DNA) viral de forma exponencial a cada ciclo de reação, gerando de centenas a milhares de cópias. Essa metodologia pode ser realizada tanto em amostras de citologia em meio líquido, como em amostras de biópsia (BENEVOLO et al., 2016).

A base de uma PCR consiste na amplificação de uma sequência específica do DNA molde através das etapas de desnaturação, pareamento e extensão. Inicialmente, as dupla-fitas do DNA são desnaturadas em fitas simples pelo aquecimento a 95 °C, liberando os sítios que serão reconhecidos pelos iniciadores. Em seguida, a amostra é submetida à temperatura de pareamento, que é específica para cada iniciador, mas que varia em torno de 60 °C. Nesta etapa, os iniciadores senso e anti-senso se pareiam de forma complementar e específica ao alvo, e a formação do complexo iniciador-DNA permite o seu reconhecimento pela enzima *Taq* polimerase, que promoverá a extensão da fita cópia pela adição dos nucleotídeos à região 3' do iniciador (Figura 5). Em uma reação de PCR convencional, após o fim das reações, os produtos amplificados (*amplicons*) são submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose para a avaliação

qualitativa da presença do material genético do vírus em questão (SILVA et al., 2015).

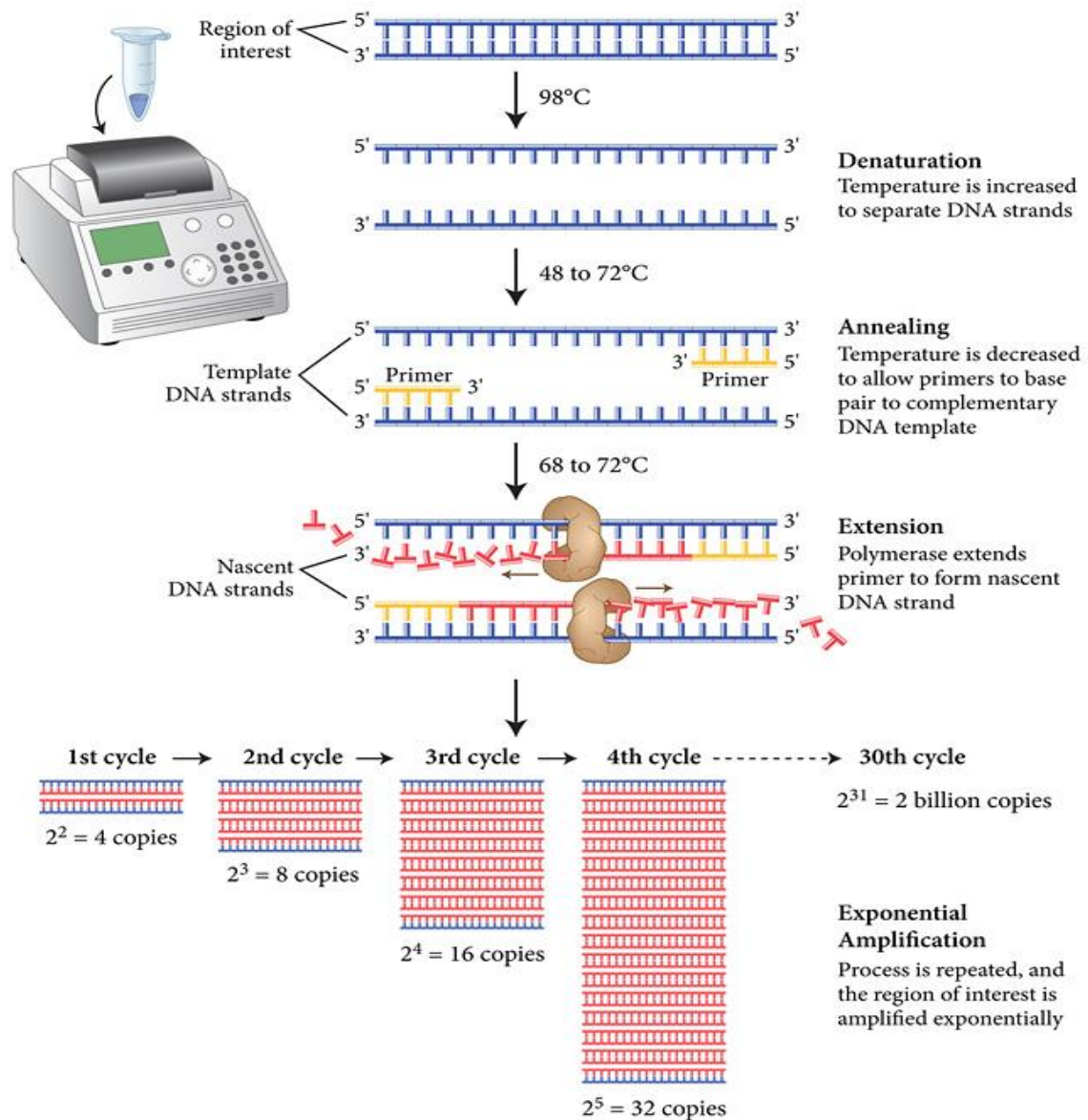


Figura 5: Amplificação de DNA alvo pela PCR. Na primeira etapa do ciclo as amostras são submetidas à temperatura de 95°C para a desnaturação das fitas de DNA, permitindo posteriormente o pareamento dos iniciadores e a extensão da fita cópia, sob temperaturas específicas da reação. Conforme há a ocorrência dos ciclos, o número de cópias aumenta de forma exponencial. Fonte: <https://www.neb.com/>

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Diagnosticar infecção pelo HPV e correlacionar os subtipos virais genotipados com os tipos de lesão intraepitelial identificadas em mucosa anal, de mulheres imunocompetentes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a presença do DNA de HPV e proceder genotipagem para os subtipos 6, 16, 18, 31 e 33, em amostras anais de mulheres positivas para o HPV;
- Identificar lesões em tecido anal submetido à biópsia;
- Correlacionar os subtipos virais identificados com o tipo das lesões intraepiteliais anais;
- Investigar se alguns hábitos de vida influenciam na infecção pelo HPV, bem como na progressão do grau das lesões anais.

4 METODOLOGIA

4. 1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional descritivo, de caráter qualitativo e com corte transversal.

4. 2 POPULAÇÃO E AMOSTRAGEM

A população foi formada pelas pacientes atendidas no Serviço de Pélvis do Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) e no Serviço de Ginecologia do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira – IMIP. A amostragem foi constituída por 95 voluntárias, com idade superior a 18 anos, que apresentaram diagnóstico prévio de lesões intraepiteliais cervicais e invasivas, e que foram submetidas ao exame de anoscopia com magnificação de imagem.

4. 3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Como critérios de inclusão das voluntárias na pesquisa foram necessários como pré-requisitos, serem do sexo feminino, estarem na faixa etária compreendida entre 18 e 60 anos, pacientes que se enquadravam nos critérios para realização da avaliação anuscópica e pacientes que aceitaram participar do projeto, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (APÊNDICE A).

4. 4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Como critérios de exclusão foram estabelecidos pacientes portadoras do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), pacientes imunossuprimidas por outros fatores não relacionados ao HIV (doenças autoimunes e transplantadas), pacientes em uso de terapia antiviral recente, pacientes vacinadas para o HPV (6, 11, 16 e 18), pacientes que apresentaram infecção recente, gravidez, puerpério e pacientes que recusarem assinar o TCLE.

4. 5 COLETA DE DADOS

Após concordar com o estudo, assinando o TCLE, cada paciente foi entrevistada, respondendo às perguntas presentes no questionário padronizado, o qual continha informações sobre os aspectos socioeconômicos e clínicos, além de informações sobre tabagismo e etilismo (APÊNDICE B). Cada paciente foi identificada por um número aleatório sequencial de protocolo.

A coleta de células anais, que foram utilizadas para a identificação do DNA do HPV, foi realizada por meio de uma escova citológica, introduzida delicadamente, 3 cm para o interior do canal, sendo então realizada rotação de 360° em torno do seu eixo por 5 vezes, e em seguida, foi retirada em um movimento em espiral, exercendo-se leve pressão lateral sobre as paredes do canal anal. Imediatamente após a retirada, a ponta da escova foi agitada, para liberar as células coletadas, no interior de um tubo de 1,5 mL contendo soro fisiológico e transportadas ao Laboratório de Imunopatologia keizo Asami (LIKA/UFPE), onde foram realizados todos os procedimentos biomoleculares.

Posteriormente, foi realizado o exame de anoscopia com magnificação de imagem, que consiste na visualização do canal anal (até a zona de transição com o reto), por meio do colposcópio, e adição de ácido acético a 4%, para melhorar a identificação de lesões não perceptíveis. Na presença de lesões acetobranças foi coletado material para biópsia. O material foi acondicionado em frascos contendo solução fixadora de formol tamponado a 10%, e encaminhado para o setor de Patologia do HCP e IMIP, onde foi fixado em parafina e processado por técnica histopatológica padrão.

4. 6 ANÁLISE MOLECULAR

4. 6. 1 Extração de ácidos nucleicos

A extração do DNA foi realizada com o kit comercial DNeasy blood & Tissue Handbook Qiagen®, seguindo instruções do fabricante. O DNA extraído foi conservado a -20°C. O gene da β -globina foi utilizado para controle de qualidade de extração, mostrando que as amostras continham DNA adequado e livre de

substâncias inibitórias da PCR (du Breuil *et al*, 1993).

4. 6. 2 Detecção de DNA do HPV

A identificação da presença do HPV foi realizada através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando *primers* para a região do gene L1 do HPV, MY09/11 (5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3'/ GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3') (Manos *et al*, 1989) e GP5+/GP6+ (5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC - 3'/5'- GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3') (Husman *et al*, 1995) que produzem um amplicon de 450pb e 150 pb, respectivamente.

Foram utilizados primers específicos para os seguintes genótipos do HPV: HPV6, 16, 18, 31 e 33. As sequências dos primers estão listadas na tabela 1. As condições da PCR utilizadas para os primers HPV6, 18, 31 e 33 foram: (i): 94°C -5 minutos, (ii) 35 ciclos de amplificação a 95°C - 30 segundos, 57°C - 30 segundos e 72°C – 1 minuto, (iii) e uma extensão final a 72 ° C - 10 minutos. Para o primer HPV16 a temperatura de anelamento foi 60°C, as demais etapas ocorreram nas mesmas condições.

Tabela 1: Sequências dos *primers* utilizados como iniciadores na genotipagem dos HPV analisados

Genótipo	Primer	Sequência	Pb
HPV-6*	F R	5'-CTGTTTCGAGGCGGCTATC-3' 5'-TGGAGGTTGCAGGTCTAAT-3'	323
HPV-16**	F R	5'-TCAAAA GCC ACT GTG TCC TGA-3' 5'-CGT GTT CTT GAT GAT CTG CAA-3'	119
HPV-18**	F R	5'-CCG AGC ACG ACA GGA ACG ACT 5'-TCG TTT TCT TCC TCT GAG TCG CTT-3'	172
HPV-31**	F R	5'-CTA CAG TAA GCA TTG TGC TAT GC-3' 5'-ACG TAA TGG AGA GGT TGC AAT AAC CC-3'	153
HPV-33**	F R	5'-AAC GCC ATG AGA GGA CAC AAG-3' 5'-ACA CAT AAA CGA ACT GTG GTG-3'	211

Tabela adaptada de* Wang *et al*, 2010 e ** Karlsen *et al*, 1996.

4. 7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste Qui-quadrado e teste exato de Fisher foram utilizados para comparações entre genótipos do HPV e perfil das pacientes. O teste de Mann-Whitney (dados não pareados) foi usado para comparação entre dois grupos e o teste de Kruskal-Wallis foi aplicado para testar as diferenças significativas de dados entre grupos (3 grupos). Para todos os testes utilizados foi considerada $p < 0.05$ significativo.

4. 8 ASPÉCTOS ÉTICOS

A realização deste projeto considerou a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde que rege sobre a ética da pesquisa envolvendo seres humanos direta ou indiretamente, assegurando a garantia de que a privacidade do sujeito da pesquisa foi preservada.

O presente estudo apresenta-se como uma extensão do trabalho intitulado “Análise da Expressão de Moléculas do Sistema Imune Inato nas Mucosas Cervical e Anal de Pacientes Infectados pelo *Papillomavírus Humano*”, tendo a devida aprovação do Comitê de ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Pernambuco, com o parecer de número 301.040 (ANEXO C).

5 GENOTIPAGEM PARA O HPV EM PACIENTES COM NEOPLASIAS INTRAEPITELIAIS ANAIS

INTRODUÇÃO

O câncer anal são tumores que ocorrem no canal e bordas externas do ânus. Apresenta-se como uma neoplasia rara, representando de 1 a 2% de todos os tumores do cólon, sendo o carcinoma epidermóide responsável por 85% dos casos ⁽¹⁾. Atualmente, a incidência dessa doença vem aumentando, muitas vezes com um comportamento mais agressivo e de difícil resposta ao tratamento ⁽²⁾.

A American Cancer Society estimou para o ano de 2017 cerca de 8.200 novos casos de câncer anal (5.250 em mulheres e 2.950 em homens) nos Estados Unidos, com uma estimativa de 1.100 mortes, dentre as quais 650 relacionadas ao sexo feminino ⁽³⁾. No Brasil, de acordo com o último levantamento de dados realizado pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), o número de óbitos, em 2013, foi de aproximadamente 348, sendo 106 homens e 242 mulheres ⁽¹⁾.

O câncer anal apresenta como estágio precedente a neoplasia escamosa intraepitelial (NIA) ⁽⁴⁾, possuindo como fatores de risco a infecção persistente pelo *Human Papillomavirus* (HPV), imunossupressão, comportamento sexual de risco, tabagismo e outras infecções associadas ao HPV, como câncer de colo de útero, vagina e vulva ^(5, 6).

O HPV pertence a um grupo de vírus de DNA, normalmente transmitidos pelo contato sexual. Eles podem infectar as regiões genitais e anorretais, boca e garganta de homens e mulheres ⁽⁷⁾. Mais de 200 tipos de HPV são descritos, dos quais, pelo menos, treze são considerados de alto risco para o desenvolvimento de neoplasias ⁽⁸⁾.

Grande parte das infecções por HPV são transitórias e se resolvem espontaneamente pelo sistema imune, não necessitando de tratamento. Entretanto, em um número pequeno, porém significativo de indivíduos, a infecção se torna persistente, permanecendo latente por tempo variável, sendo posteriormente reativada, podendo resultar em lesões precursoras de diferentes graus, as quais podem progredir para o câncer ^(9, 10).

A aplicação de técnicas de rastreio contribui para a redução dos casos de câncer anal, através da detecção de lesões pré-malignas. Essas técnicas incluem a citologia anal e a anoscopia de alta resolução. O rastreamento tem sido proposto para os grupos de maior risco como homens que praticam sexo com homens, pacientes HIV positivos, pacientes transplantados em uso de imunossupressores e mulheres com neoplasia intraepitelial ou câncer do colo de útero, vagina e vulva ⁽¹¹⁾.

Além disso, os métodos de biologia molecular também merecem importância, por possibilitarem a identificação de genótipos de alto risco oncogênico, que estão intimamente relacionados à etiologia das lesões intraepiteliais do trato anogenital, particularmente os subtipos 16 e 18 ⁽¹²⁾.

Tendo em vista o crescente aumento dos casos de lesões intraepiteliais anais e dos cânceres anais, o presente estudo objetivou avaliar os fatores de risco associados a essa neoplasia, em mulheres que apresentavam lesões intraepiteliais cervicais. Para estes fins, foi feita uma análise do perfil comportamental das mulheres estudadas e avaliação da prevalência da infecção anal pelo HPV, fator esse intimamente relacionado ao desenvolvimento dos tumores anais.

OBJETIVOS

Diagnosticar infecção pelo HPV e correlacionar os subtipos virais genotipados com os tipos de lesão intraepitelial identificadas em mucosa anal de mulheres imunocompetentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo observacional descritivo, de caráter qualiquantitativo, com corte transversal para avaliar a associação da infecção pelo HPV com lesões precursoras do câncer anal em mulheres atendidas no Serviço de Pélvis do Hospital de Câncer de Pernambuco e no Serviço de Ginecologia do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira – IMIP, entre os anos de 2014 e 2016.

A amostragem foi constituída por 95 voluntárias, com idade superior a 18 anos, que apresentaram diagnóstico prévio de lesões cervicais intraepiteliais e invasivas, e que foram submetidas ao exame de anoscopia com magnificação de imagem. Os critérios de exclusão foram: pacientes portadoras do vírus da

Imunodeficiência Adquirida (HIV), pacientes imunossuprimidas por outros fatores não relacionados ao HIV (doenças autoimunes e transplantadas), pacientes em uso de terapia antiviral recente, pacientes vacinadas para o HPV (6, 11, 16 e 18), pacientes que apresentaram infecção recente, gravidez, puerpério e pacientes que não quiseram participar da pesquisa.

Esta pesquisa foi realizada após aprovação do comitê de ética em pesquisa do Hospital de Câncer de Pernambuco, com o parecer de número 301.040. Todas as pacientes participaram voluntariamente do estudo, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Cada paciente foi entrevistada individualmente, respondendo às perguntas presentes em um questionário padronizado, o qual continha informações sobre os aspectos socioeconômicos e clínicos, além de informações sobre tabagismo e etilismo.

A coleta de células anais, que foram utilizadas para a identificação do DNA do HPV, foi realizada por meio de uma escova citológica que foi introduzida delicadamente, 3 cm para o interior do canal, sendo então realizada rotação de 360° em torno do seu eixo por 5 vezes, e em seguida, foi retirada em um movimento em espiral, exercendo-se leve pressão lateral sobre as paredes do canal anal. Imediatamente após a retirada, a ponta da escova foi agitada, para liberar as células coletadas, no interior de um tubo de 1,5 mL contendo soro fisiológico e transportadas ao Laboratório de Imunopatologia keizo Asami (LIKA/UFPE), onde foram realizados todos os procedimentos biomoleculares.

Posteriormente, foi realizado o exame de anoscopia com magnificação de imagem, que consiste na visualização do canal anal (até a zona de transição com o reto), por meio do colposcópio, e adição de ácido acético a 4% para identificação de lesões não perceptíveis. Na presença de lesões acetobranças foi coletado material para biópsia. O material foi acondicionado em frascos contendo solução fixadora de formol tamponado a 10%, e encaminhado para o setor de Patologia do HCP e IMIP, onde foi fixado em parafina e processado por técnica histopatológica padrão.

Os testes moleculares foram iniciados mediante extração do DNA, realizada com o kit comercial DNeasy blood & Tissue Handbook Qiagen®, seguindo instruções do fabricante. O DNA extraído foi conservado a -20°C. O gene da β -globina foi utilizado para controle de qualidade de extração, mostrando que as amostras continham DNA adequado e livre de substâncias inibitórias da PCR (du

Breuil *et al*, 1993).

A identificação da presença do HPV foi realizada através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando primers para a região do gene L1 do HPV, MY09/11 (5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3'/ GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3') (Manos *et al*, 1989) e GP5+/GP6+ (5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC - 3'/5'- GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3') (Husman *et al*, 1995) que produzem um amplicon de 450pb e 150 pb, respectivamente.

Foram utilizados primers específicos para os seguintes genótipos do HPV: HPV6, 16, 18, 31 e 33. As sequências dos primers estão listadas na tabela 1. As condições da PCR utilizadas para os primers HPV6, 18, 31 e 33 foram: (i): 94°C -5 minutos, (ii) 35 ciclos de amplificação a 95°C - 30 segundos, 57°C - 30 segundos e 72°C – 1 minuto, (iii) e uma extensão final a 72 ° C - 10 minutos. Para o primer HPV16 a temperatura de anelamento foi 60°C, as demais etapas ocorreram nas mesmas condições.

Tabela 1: Sequência dos *primers* utilizados como iniciadores na genotipagem dos HPV analisados

Genótipo	Primer	Sequência	pb
HPV-6*	F R	5'-CTGTTTCGAGGCGGCTATC-3' 5'-TGGAGGTTGCAGGTCTAAT-3'	323
HPV-16**	F R	5'-TCA AAA GCC ACT GTG TCC TGA-3' 5'-CGT GTT CTT GAT GAT CTG CAA-3'	119
HPV-18**	F R	5'-CCG AGC ACG ACA GGA ACG ACT 5'-TCG TTT TCT TCC TCT GAG TCG CTT-3'	172
HPV-31**	F R	5'-CTA CAG TAA GCA TTG TGC TAT GC-3' 5'-ACG TAA TGG AGA GGT TGC AAT AAC CC-3'	153
HPV-33**	F R	5'-AAC GCC ATG AGA GGA CAC AAG-3' 5'-ACA CAT AAA CGA ACT GTG GTG-3'	211

Tabela adaptada de *Wang *et al.*⁽¹⁶⁾, 2010 e **Karlsen *et al.*⁽¹⁷⁾, 1996.

Os resultados foram analisados mediante utilização do teste Qui-quadrado e do teste exato de Fisher, para comparações entre genótipos do HPV e perfil das pacientes.

RESULTADOS

Das 95 mulheres que participaram da pesquisa, 41 (43%) apresentaram, na biópsia, resultado compatível com lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL) e 21 (22%) mulheres foram diagnosticadas com lesão intraepitelial de alto grau (HSIL). Em relação ao perfil das pacientes, a idade média observada foi 40,6; 25 (26,3%) relataram hábito de fumar e 41 (43%) delas disseram ingerir bebida alcoólica (Tabela 2).

Associando os dados referentes ao comportamento sexual dessas mulheres aos resultados obtidos pelo exame histopatológico, podemos observar que a idade média da primeira relação sexual foi em torno dos 17 anos, nas pacientes com LSIL e HSIL. O número médio de parceiros sexuais foi 3,6 e 5,3 para pacientes com LSIL e HSIL, respectivamente. Das pacientes que apresentaram LSIL (n=41), 25 (60%) afirmaram praticar sexo anal receptivo, enquanto que 18 (85,7%) das 21 mulheres com HSIL relataram intercurso anal. Em relação ao uso de preservativos sexuais, de todas as pacientes, apenas 6 (6,3%) relataram o uso, sendo que nenhuma das pacientes que apresentaram HSIL (n=21) usavam preservativos (Tabela 2).

Tabela 2 - Aspectos clínico-epidemiológicos de biópsias anais de pacientes atendidas em Recife (PE) entre os anos de 2014 e 2016

Aspectos	Total (n=95)	Normal (n=33) (34,7%)	LSIL* (n=41) (43%)	HSIL** (n=21) (22%)
Idade média	40,6	39,2	40,9	42,2
Tabagismo	25 (26,3%)	10 (30,3%)	9 (21,9%)	6 (28,5%)
Etilismo	41 (43%)	13 (39,3%)	19 (46,3%)	9 (42,8%)
Primeira relação sexual	17,5	17,3	17,7	17,4
Número médio de parceiros sexuais	4,1	4,1	3,6	5,3
Intercurso anal	67 (70,5%)	24 (72,7%)	25 (60%)	18 (85,7%)
Uso de preservativo	6 (6,3%)	3 (9%)	3 (7,3%)	-

*Incluídos Condilomas, Pólipos e Neoplasia Intraepitelial Anal de grau 1 (NIA1)

**Incluídos Neoplasia Intraepitelial Anal de grau 2 e 3 (NIA2 e NIA3) e Câncer do canal anal

Dentre as 95 amostras coletadas para a investigação de infecção anal pelo HPV, 67 (70,5%) demonstraram positividade para o DNA viral, mediante técnica de PCR. 30 amostras foram compatíveis para os subtipos virais pesquisados: HPV 6, 16, 18, 31 e 33. O genótipo mais prevalente foi o do HPV 6 (22,5%), seguido pelo HPV 33 (7,4%), HPV 31 (5,9%), HPV 16 (2,9%) e HPV 18 (1,4%) (Tabela 3).

Além das infecções causadas por subtipos virais únicos, também foi demonstrada a presença de coinfeções virais nas amostras analisadas. No total, 4 pacientes apresentaram esse tipo de infecção múltipla, incluindo infecção pelo genótipo 18, que foi identificado apenas em associação com o subtipo viral 31 (n=1). Adicionalmente, foi demonstrado que 37 pacientes possuíam positividade para o DNA do HPV, mas não se enquadravam nos subtipos virais genotipados. Esses resultados foram agrupados na classificação designada “outros HPVs”. Quando analisamos a frequência dos tipos virais em biópsias com resultados anormais, nós encontramos 29 amostras com LSIL, positivas para o HPV, e 19 amostras com HSIL positivas para a infecção viral (Tabela 3).

Tabela 3 - Frequência de infecção por HPV associada aos tipos de lesão intraepitelial anal

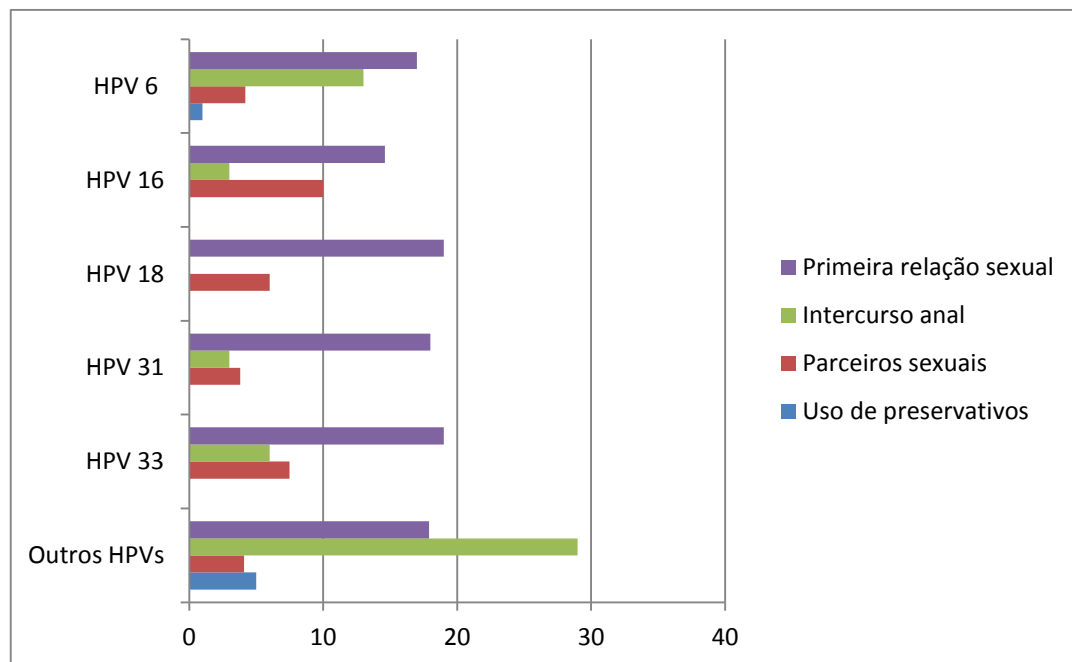
Tipo de HPV	Total (n=67) (70,5%)	Normal (n=19) (28,3%)	LSIL* (n=29) (43,2%)	HSIL** (n=19) (28,3%)
Infecção única				
6	15 (22,5%)	3 (15,7%)	7 (24%)	5 (26,3%)
16	2 (2,9%)	-	1 (3,4%)	1 (5,2%)
18	-	-	-	-
31	4 (5,9%)	1 (5,2%)	1 (3,4%)	2 (10,5%)
33	5 (7,4%)	-	3 (10,3%)	2 (10,5%)
Infecção múltipla				
6+16	1 (1,4%)	-	1 (3,4%)	-
6+33	1 (1,4%)	-	-	1 (5,2%)
18+31	1 (1,4%)	-	1 (3,4%)	-
31+33	1 (1,4%)	-	-	1 (5,2%)
Outros HPVs	37 (55,2%)	15 (78,9%)	15 (51,7%)	7 (36,8%)

*LSIL, Lesão Intraepitelial de Baixo Grau

**HSIL, Lesão Intraepitelial de Alto Grau

Na figura 1 pode-se observar o perfil de alguns hábitos sexuais das participantes do estudo, para cada genótipo de HPV identificado. A idade média da primeira relação sexual variou entre 14 e 19 anos, sendo as mulheres positivas para o HPV 16 as que apresentaram atividade sexual mais precoce. Avaliando a prática sexual anal, observamos que 13 mulheres, positivas para o genótipo 6 do HPV, realizavam sexo anal, sendo que apenas uma delas utilizava preservativo sexual durante o ato. Ainda em relação ao uso de preservativos, identificamos que grande parte das participantes do estudo relatou não utilização da camisinha durante o sexo anal. Por fim, as mulheres foram questionadas sobre o número de parceiros sexuais ao longo da vida. Esses valores variaram entre uma média de 3,8 em mulheres positivas para o HPV 31 e 10 parceiros sexuais em mulheres que apresentaram positividade para o HPV 16.

Figura 1 - Relação entre os fatores de risco e o tipo de HPV identificado por genotipagem em mucosa anal



DISCUSSÃO

A incidência do câncer anal vem demonstrando aumento considerável desde os últimos 30 anos, principalmente nos grupos ditos de risco. A história natural do

câncer e suas lesões precursoras, em indivíduos negativos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), sugere uma incidência maior em mulheres do que em homens, principalmente na presença de neoplasias intraepiteliais cervicais e vulvares, associadas ao HPV. No entanto, não há evidências suficientes na literatura sobre a evolução das lesões precursoras em mulheres HIV negativas.

Nosso estudo englobou mulheres imunocompetentes, que apresentavam lesões cervicais, previamente diagnosticadas. Nesse grupo, a prevalência de neoplasia intraepitelial anal foi elevada. Este achado encontra-se de acordo com estudos, que demonstram um aumento progressivo da neoplasia intraepitelial anal e câncer anal em mulheres com história de neoplasia genital ^(18, 19). Além disso, podemos inferir que os mesmos fatores que contribuem para o desenvolvimento da neoplasia cervical contribuem também para o desenvolvimento da neoplasia anal, em função das similaridades embriológicas, anatômicas e epidemiológicas existentes entre essas regiões ^(20, 21).

Em relação ao estilo de vida, uma parcela considerável das mulheres estudadas referiu ingerir bebida alcoólica, relatando também o hábito de fumar. Mulheres que vivem em áreas urbanas estão inseridas num contexto cultural que estimula o consumo regular de bebidas alcoólicas, tabaco e outras drogas ⁽²²⁾. O álcool, por sua vez, consumido de maneira abusiva, estimula práticas sexuais de risco, como, por exemplo, o sexo desprotegido, fato que contribui para o surgimento das infecções sexualmente transmissíveis (ISTs), dentre elas o HPV ^(22, 23).

O tabagismo é um dos fatores de risco para diversos tipos de câncer. O tabaco é um carcinógeno que atua tanto como indutor (efeito mutagênico), como promotor (proliferação celular) de alterações celulares ^(24, 25). De acordo com Josefsson *et al.* ⁽²⁶⁾, o epitélio cervical das fumantes apresenta uma redução das células de Langerhans, facilitando as lesões virais, que seriam o primeiro passo no processo de carcinogênese. Ademais, estudos sugerem associações significativas entre câncer de colo uterino e infecção por HPV para usuárias de álcool, tabaco e outras drogas. Todavia, em mulheres com HPV anal e/ou câncer anal, essa associação permanece incerta ^(22, 27, 28).

O conhecimento sobre o comportamento sexual de uma população é necessária, pois possibilita uma melhor compreensão acerca da dinâmica de transmissão do HPV, entre parceiros sexuais. Diversos estudos sugerem que o início precoce da atividade sexual (entre 15 a 19 anos) é um fator de risco elevado para a

infecção pelo HPV. Em nosso estudo, observamos que as mulheres analisadas relataram uma idade média de 17 anos para a primeira experiência sexual, grande parte delas sem uso de preservativos. Essas atitudes tornam esse grupo mais vulnerável às ISTs, e os preconceitos e tabus culturais limitam a abordagem dessa realidade pelos serviços de saúde ⁽²⁹⁾. Um fato intrigante observado por Simpson *et al.* ⁽³⁰⁾, foi o baixo efeito protetor do preservativo contra a infecção anal pelo HPV. Esses pesquisadores também relataram uma alta prevalência de HPV anal não associada ao sexo anal receptivo, sugerindo a existência de outras formas de contrair esse vírus. Isso pode ocorrer por contato sexual mediante o uso dos dedos, utilização de itens eróticos, contato sem penetração e o modo de higienização vaginal realizado por algumas mulheres ^(22, 30).

Quando se analisa a relação de outras ISTs com o câncer anal a literatura apresenta considerável escassez. Durães *et al.* ⁽³¹⁾, avaliando dados provenientes do Brasil, observaram uma correlação moderada, porém sem significância estatística entre pacientes HIV positivos. Outros estudos mostram uma baixa correlação entre HIV e Câncer Anal ⁽³²⁾. O que se sabe é que o prognóstico dos pacientes HIV positivos com Câncer Anal é pior do que os pacientes HIV negativos ^(32, 33). O HIV pode ser considerado como mediador do risco de neoplasia anal relacionada ao HPV ⁽³³⁾.

Quando comparada a relação entre o câncer anal e infecções como sífilis e gonorreia, os dados não demonstram correlação positiva. Não há relatos na literatura dessas relações ⁽³¹⁾. Em relação à infecção pela *Chlamydia trachomatis* estudos apresentam fortes indícios de que essa bactéria, juntamente com o HPV, está envolvida na etiologia da neoplasia intraepitelial cervical e consequentemente no carcinoma cervical ⁽³⁴⁾. A *Chlamydia* parece aumentar a susceptibilidade à infecção pelo HPV, além de modular a resposta imune humoral, interferindo na resolução da infecção viral ⁽³⁵⁾. Essas associações merecem destaques e necessitam de estudos mais elaborados quando se refere aos cânceres anais.

Em concordância com os nossos resultados, o estudo de Heráclio *et al.* ⁽²⁵⁾ também identificou uma alta prevalência de infecção anal pelo HPV, em mulheres que participaram da pesquisa. Grande parte dessa infecção foi diagnosticada em mulheres que apresentaram algum tipo de lesão anal. Esse achado corrobora o papel desempenhado pelo HPV no desenvolvimento de lesões intraepiteliais anais.

Quando se avalia os tipos de HPV genotipados, observamos uma maior

prevalência do subtipo viral 6, tanto em pacientes com biópsias normais quanto nas biópsias que apresentaram lesões. Esse subtipo viral é referido na literatura como um vírus de baixa oncogenicidade, não sendo comum a sua associação com a neoplasia anal e o câncer anal ^(36, 37).

Considerando a relação entre o câncer anogenital e o HPV, o subtipo viral 16 é o que apresenta maior prevalência mundialmente, com exceção da Indonésia, que apresenta o subtipo 18 como o mais comum. O Brasil, um país de dimensões continentais, segue a tendência mundial, com o HPV 16 sendo o mais prevalente. O segundo tipo mais encontrado difere de acordo com a região analisada ⁽³⁸⁾. Nas regiões Nordeste e Centro-oeste, o HPV 16 é seguido pelos subtipos 31 e 33, enquanto que nas regiões Norte, Sul e Sudeste, o segundo tipo mais prevalente é o 18 ⁽³⁹⁾. Em relação à região metropolitana do Recife, localizada no Nordeste brasileiro, Silva *et al.* ⁽³⁸⁾, demonstraram que os tipos virais mais prevalentes foram o HPV 16, seguido pelo HPV 31, HPV 18 e HPV 33. Esses achados corroboram em parte com os nossos resultados, tendo em vista que o nosso estudo também observou a presença dos genótipos 31 e 33, dentre as participantes analisadas.

Nosso estudo também observou, embora com reduzida frequência, a presença de coinfeções virais, pelo HPV, todas elas presentes em pacientes que apresentaram lesões anais. A multiplicidade de parceiros sexuais contribui para esse fato, tendo em vista que mulheres com tal comportamento possuem maior possibilidade de contato com diferentes tipos de HPV a cada contato com novo parceiro sexual ⁽⁴⁰⁾. Além disso, alguns estudos mostram que infecções prévias pelo HPV, na região anogenital, aumentam o risco de aquisição de outros genótipos deste vírus, tanto em homens quanto em mulheres ⁽⁴¹⁾.

CONCLUSÕES

Nosso estudo identificou considerável prevalência de lesão intraepitelial anal, entre as mulheres estudadas. Observamos que uma elevada parcela dessas lesões está associada ao estilo de vida e hábitos sexuais considerados de risco para o seu desenvolvimento. Esse comportamento contribui para a aquisição da infecção pelo vírus HPV, descrito pela literatura como o principal fator de risco para o câncer anal e suas lesões precursoras. O diagnóstico precoce dessas lesões, bem como a

identificação de subtipos oncogênicos do HPV pode contribuir para a redução das taxas de câncer do canal anal, e consequentemente do índice de morbidade e mortalidade decorrentes dessa neoplasia.

REFERÊNCIAS

Instituto Nacional de Câncer (Inca). Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativas 2013: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Inca; 2013.

Nelson VM, Berson AB. Epidemiology of Anal Canal Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*, v. 67, n. 1, p. 9-15, 2017.

Siegel MPH, Rebeca I, Kimberly D. *et al.* Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*, v. 67, n. 1, p. 7-30, 2017.

Berry JM, Jay RD, Cranston TM. *et al.* Progression of anal high-grade squamous intraepithelial lesions to invasive anal cancer among HIV-infected men who have sex with men. *Int J Cancer*, v. 134, n. 5, p. 1147-55, 2014.

Stier EA, Sebring MC, Mendez AE. *et al.* Prevalence of anal human papillomavirus infection and anal HPV-related disorders in women a systematic review. *Am J Obstet Gynecol*, v. 213, n. 3, p. 278-309, 2015.

Moscicki AB, Darragh TM, Berry-Lawhorn JM. *et al.* Screening for anal cancer in women. *J Low Genit Tract Dis*, v. 19, n. 3, p. 27-42, 2015.

Doorbar J, Egawa N, Griffin H. *et al.* Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol*, v. 25, n. 1, p. 2-23, 2015.

Spiess PE, Dhillon J, Baumgarten AS. *et al.* Pathophysiological basis of human papillomavirus in penile cancer: Key to prevention and delivery of more effective therapies. *CA Cancer J Clin*, v. 66, n. 6, p. 481-95, 2016.

Bernardi MP, Ngan SY, Michael M. *et al.* Molecular biology of anal squamous cell carcinoma: implications for future research and clinical intervention. *Lancet Oncol*, v. 16, n. 16, p. 611-21, 2015.

Van DWP, Van IE, Wolffs P. *et al.* Correlation between viral load, multiplicity of infection, and persistence of HPV16 and HPV18 infection in a Dutch cohort of young women. *J Clin Virol*, v. 83, p. 6-11, 2016.

Cuming T, Nathan M. Anal cancer screening: Techniques and guidelines. *Sem Colon Rectal Surg*, v. 28, n. 2, p. 69-74, 2017.

Benevolo M, Dona MG, Ravenda PS. *et al.* Anal human papillomavirus infection: prevalence, diagnosis and treatment of related lesions. *Expert Rev Anti Infective Ther*, v. 14, n. 5, p. 465-77, 2016.

Manos MM, Ting Y, Wright DK. *et al.* The use of Polymerase Chain reaction Amplification for the Detection of Genital Human Papillomaviruses. *Cancer Cells*, v. 7, p. 209-214, 1989.

Wang X, Tian X, Liu F. Detection of HPV DNA in esophageal cancer specimens from different regions and ethnic groups: a descriptive study. *BMC Cancer*, v. 10, n. 19, p. 10-19, 2010.

Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A. Use of Multiple PCR Primer Sets for Optimal Detection of Human Papillomavirus. *J Clin Microbiol*, v.34, n. 9, p. 2095-100, 1996.

Georgieva S, Iordanov V, Sergieva S. Nature of cervical cancer and other HPV-associated cancers. *J BUON*, v. 14, n. 3, p. 391-8, 2009.

Castro FA, Quint W, Gonzalez P. *et al.* Prevalence of and risk factors for anal human papillomavirus infection among young healthy women in Costa Rica. *J Infect Dis*, v. 2016, n. 7, p. 1103-10, 2012.

Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet*, v. 355, n. 9222, p. 2189-93, 2000.

Giraldo P, Jacyntho C, Costa C. *et al.* Prevalence of anal squamous intra-epithelial lesion in women presenting genital squamous intra-epithelial lesion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v. 142, n. 1, p. 73-5, 2009.

Hessol NA, Holly EA, Efird JT. *et al.* Anal intraepithelial neoplasia in a multisite study of HIV-infected and high-risk HIV-uninfected women. *AIDS*, v. 23, n. 1, p. 59-70, 2009.

Crawford R, Grignon AL, Kitson S. *et al.* High prevalence of HPV in non-cervical sites of women with abnormal cervical cytology. *BMC Cancer*, v. 11, p. 11-473, 2011.

Heráclio AS, Araújo TA, Souza ASR. *et al.* Prevalência da lesão HPV induzida em canal anal de mulheres com neoplasia intraepitelial cervical 2 e 3: um estudo de corte transversal. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet*, v. 37, n. 10, p. 480-5, 2015.

Dermen KH, Thomas SN. Randomized controlled trial of brief interventions to reduce college students' drinking and risky sex. *Psychol Addict Behav*, v. 25, n. 4, p. 583-94, 2011.

Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG. *et al.* Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. *Cancer* v. 101, n. 2, p. 270-80, 2004.

Roura E, Castellsagué X, Pawlita M. *et al.* Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: results from the EPIC cohort. *Int J Cancer*, v. 135, n. 2, p. 453-66, 2014.

Fernandes AM, Antonio DG, Bahamondes LG. *et al.* Conhecimento, atitudes e práticas de mulheres brasileiras atendidas pela rede básica de saúde com relação às doenças de transmissão sexual. *Cad Saúde Pública*, v. 16, n. 1, 103-12, 200.

Simpson S, Blomfield P, Cornall A. *et al.* Front-to-back & dabbing wiping behaviour post-toilet associated with anal neoplasia & HR-HPV carriage in women with previous HPV-mediated gynaecological neoplasia. *Cancer Epidemiol*, v. 42, p. 124-32, 2016.

Durães LC, Souza JB. Câncer anal e doenças sexualmente transmissíveis: Qual a correlação?. *Rev Col Bras*, v. 37, n. 4, p. 265-2010, 2010.

Wasserberg N, Nunoo-Mensah JW, Gonzalez-Ruiz C. *et al.* Colorectal cancer in HIV-infected patients: a case control study. *Int J Colorectal Dis*, v. 22, n. 10, p. 1217-21, 2007.

DUARTE-FRANCO, E.; FRANCO, EL. Epidemiologia e fatores de risco em carcinoma de canal anal. In: ROSSI, B. M.; NAKAGAWA, W. T.; FERREIRA, F. O.; AGUIAR JUNIOR, S.; LOPES, A. *Câncer de cólon, reto e ânus*. 1ª ed. São Paulo: Lemar e Tecmedd, 2004. p. 665-77.

Tamim H, Finan RR, Sharida HE. *et al.* Cervicovaginal coinfections with human papillomavirus and *Chlamydia trachomatis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 43, n. 4, p. 277-281, 2002.

Barros NKS, Alves RRF, Carneiro MAS. *et al.* O papel da associação das infecções por Papilomavirus humano e a *Chlamydia trachomatis* no desenvolvimento do câncer cervical. *REF*, v. 4, n. 2, p. 114-118, 2007.

Hoots BE, Palefsky JM, Pimenta JH. *et al.* Human papillomavirus type distribution in anal cancer and intraepithelial lesions. *Int J Cancer*, v. 124, n. 10, p. 2375-83, 2009.

Spiess PE, Dhillon J, Baumgarten AS. *et al.* Pathophysiological basis of human papillomavirus in penile cancer: Key to prevention and delivery of more effective therapies. *CA Cancer J Clin*, v. 66, n. 6, p. 481-495, 2016.

Heráclio AS, Souza ASP, Souza PRE. *et al.* Cross-sectional study of anal intraepithelial lesions in women with cervical neoplasia without HIV. *Int J Gynaecol Obstet*, v. 140, n. 2, p. 233-240, 2018.

Silva BMF, Chagas BS, Guimarães V. *et al.* HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. *Genet Mol Res*, v. 8, n. 4, p. 1437-43, 2009.

Silva AMTC, Amaral AMVT and Cruz AD. HPV e Câncer: O papel do papiloma vírus humano na carcinogênese. *Biotechnol Cienc Desenvolv*, v.29, p. 48-54, 2006.

Moscicki A, Hills N, Shiboski S. *et al.* Risks for Incident Human Papillomavirus Infection and Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Development in Young Females. *JAMA*, v. 285, n. 23, p. 2995-3002, 2001.

Woodman CBJ, Collins SI and Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*, v. 7, n. 1, p. 11-22, 2007.

6 CONCLUSÕES

Nosso estudo identificou considerável prevalência de lesão intraepitelial anal, entre as mulheres estudadas. Observamos que uma elevada parcela dessas lesões está associada ao estilo de vida e hábitos sexuais considerados de risco para o seu desenvolvimento. Esse comportamento contribui para a aquisição da infecção pelo vírus HPV, descrito pela literatura como o principal fator de risco para o câncer anal e suas lesões precursoras. O diagnóstico precoce dessas lesões, bem como a identificação dos subtipos do HPV pode contribuir para a redução das taxas de câncer do canal anal, e conseqüentemente do índice de morbidade e mortalidade decorrentes dessa neoplasia.

REFERÊNCIAS

ABERG, J. A.; GALLANT, J. E.; GHANEM, K. G. Primary care guidelines for the management of persons infected with HIV: 2013 update by the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 1, 2014.

ABRAMOWITZ, L.; BENABDERRAHMANE, D.; RAVAUD, P.; WALKER, F.; RIOUX, C.; JESTIN, C.; BOUVET, E.; SOULÉ, J. C.; LEPORT, C.; DUVAL, X. Anal squamous intraepithelial lesions and condyloma in HIV-infected heterosexual men, homosexual men and women: prevalence and associated factors. **AIDS**, v. 21, n. 11, 2007.

ALBUQUERQUE, A.; MIRANDA, H. P.; LOPES, J.; GANDARA, J.; RODRIGUES, S.; GASPAR, R.; MORAIS, R.; RAMALHO, R.; PINTO, E. R.; CARDOSO, H.; BARROCA, H.; DIAS, C. C.; CARNEIRO, F.; MACEDO, G. Liver transplant recipients have a higher prevalence of anal squamous intraepithelial lesions. **British Journal of Cancer**, v. 117, n. 12, 2017.

AMADOR-MOLINA, A.; HERNÁNDEZ-VALENCIA, J. F.; LAMOYI, E., et al. Role of Innate Immunity against Human Papillomavirus (HPV) Infections and Effect of Adjuvants in Promoting Specific Immune Response. **Viruses**, v. 5, n. 11, 2013.

BARROS, N. K. S.; ALVES, R. R. F.; CARNEIRO, M. A. S. *et al.* O papel da associação das infecções por Papilomavirus humano e a *Chlamydia trachomatis* no desenvolvimento do câncer cervical. **Revista eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 2, 2017.

BASHAW, A. A.; LEGGATT, G. R.; CHANDRA, J.; TUONG, Z. K.; FRAZER, I. H. Modulation of antigen presenting cell functions during chronic HPV Infection. **Papillomavirus Research**, v. 4, 2017.

BEAN, S. M.; CHHIENG, D. C. Anal-rectal cytology: a review. **Diagnostic Cytopathology**, v. 38, n. 7, 2010.

BENEVOLO, M.; DONA, M. G.; RAVENDA, P. S.; CHIOCCA, S. Anal human papillomavirus infection: prevalence, diagnosis and treatment of related lesions. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 14, n. 5, 2016.

BERNARDI, M. P.; NGAN, S. Y.; MICHAEL, M.; et al. Molecular biology of anal squamous cell carcinoma: implications for future research and clinical intervention. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 16, 2015.

BERRY, J. M.; JAY, R. D.; CRANSTON, T. M.; DARRAGH, E. A.; HOLLY, M. L.; WELTON, J. M.; PALEFSKY, J. M. Progression of anal high-grade squamous intraepithelial lesions to invasive anal cancer among HIV-infected men who have sex with men. **International Journal of Cancer**, v. 134, n. 5, 2014.

BORDIGNON, v.; DOMENICO, E. G.; ELISABETTA TRENTO.; D'AGOSTO, G.; CAVALLO, I.; PONTONE, M.; PIMPINELLI, F.; MARIANI, L.; ENSOLI, F. How Human Papillomavirus Replication and Immune Evasion Strategies Take Advantage of the Host DNA Damage Repair Machinery. **Viruses**, v. 9, n. 12, 2017.

BOUVIER, A. M.; BELOT, A.; MANFREDI, S. Trends of incidence and survival in squamous-cell carcinoma of the anal canal in France: a population-based study. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 25, n. 3, 2016.

BRICKMAN, C.; PALEFSKY, J. M. Human Papillomavirus in the HIV-Infected Host: Epidemiology and Pathogenesis in the Antiretroviral Era. **Current HIV/AIDS Reports**, v. 12, n. 1, 2015.

CAI, B.; RONNETT, B. M.; STOLER, M.; FERENCZY, A.; KURMAN, R. J.; SADOW, D., et al. Longitudinal evaluation of interobserver and intraobserver agreement of cervical intraepithelial neoplasia diagnosis among an experienced panel of gynecologic pathologists. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 31, n. 12, 2007.

CASTRO, F. A.; QUINT, W.; GONZALEZ, P. *et al.* Prevalence of and risk factors for anal human papillomavirus infection among young healthy women in Costa Rica. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 2016, n. 7, 2012.

CEBALLOS, K. M.; CHAPMAN, W.; DAYA, D.; JULIAN, J. A.; LYTWYN, A.; MCLACHLIN, C. M., et al. Reproducibility of the histological diagnosis of cervical dysplasia among pathologists from 4 continents. **International Journal of Gynecological Pathology**, v. 27, n. 1, 2008.

CHAVES, E. B. M.; CAPP, E.; CORLETA, Helena, V. E; FOLGIERINI, H. A Citologia na Prevenção do Câncer Anal. **Revista Feminina**, v. 39, n. 11, 2011.

CRAWFORD, R.; GRIGNON, A. L.; KITSON, S. *et al.* High prevalence of HPV in non-cervical sites of women with abnormal cervical cytology. **BMC Cancer**, v. 11, 2011

CUMING, T.; NATHAN, M. Anal cancer screening: Techniques and guidelines. **Seminars in Colon and Rectal Surgery**, v. 28, n. 2, 2017.

DAI, X.; TOHYAMA, M.; MURAKAMI, M.; SAYAMA, K. Epidermal keratinocytes sense dsRNA via the NLRP3 inflammasome, mediating interleukin (IL)-1beta and IL-18 release, **Experimental Dermatology**, v. 26, n. 10, 2017.

DARRAGH, T. M. Hpv-associated disease of the anal canal: a pathology primer. **Seminars in colon and rectal surgery**, v. 28, n. 2, 2017.

DE VILLIERS, E. M.; WAGNER, D.; SCHNEIDER, A.; WESCH, H.; MIKLAW, H.; WAHRENDORF, J., et al. Human papillomavirus infections in women with and without abnormal cervical cytology. **Lancet**, v. 330, n. 8561, 2004.

DERMEN, K. H.; THOMAS, S. N. Randomized controlled trial of brief interventions to reduce college students' drinking and risky sex. **Psychology of Addictive Behaviors**, v. 25, n. 4, 2011.

DOAN T., HERD K., STREET, M., BRYSON G., FERNANDO G., LAMBERT P., & TINDLE R. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein expression in peripheral epithelium tolerized E7-directed cytotoxic T-lymphocyte precursors restricted through human (and mouse) major histocompatibility complex class I alleles. **Journal of Virology**, v. 73, n. 7, 1999.

DOORBAR, J.; EGAWA, N.; GRIFFIN, H.; KRANJEC, C.; MURAKAMI, I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Reviews in Medical Virology**, v. 25, n. 1, 2015.

DUARTE, B. F.; SILVA, M. A. B.; GERMANO, S.; LEONART, M. S. S. Diagnóstico do câncer anal na coinfeção pelo papiloma vírus humano (HPV) e pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 75, 2016.

DUARTE-FRANCO, E.; FRANCO, EL. Epidemiologia e fatores de risco em carcinoma de canal anal. In: ROSSI, B. M.; NAKAGAWA, W. T.; FERREIRA, F. O.; AGUIAR JUNIOR, S.; LOPES, A. *Câncer de cólon, reto e ânus*. 1ª ed. São Paulo: Lemar e Tecmedd, 2004. p. 665-77.

DURÃES, L. C.; SOUZA, J. B. Câncer anal e doenças sexualmente transmissíveis: Qual a correlação?. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 37, n. 4, p. 265-2010, 2010.

FLÉJOU, J. F. An update on anal neoplasia. **Histopathology**, v. 66, n. 1, 2015.

GARCÍA-ESPINOSA, B.; NIETO-BONA, M. P.; RUEDA, S.; SILVA-SÁNCHEZ, L. F.; PIERNAS-MORALES, M. C.; CARRO-CAMPOS, P., et al. Genotypes distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with cervical lesions in Bioko, Equatorial Guinea. **Diagnostic Pathology**, v. 4, n. 4, 2009.

GEORGIEVA, S.; IORDANOV, V.; SERGIEVA, S. Nature of cervical cancer and other HPV- associated cancers. **Official Journal of the Balkan Union of Oncology**, v. 14, n. 3, 2009.

GIMENEZ, F.; COSTA, S. I. T. DAUMAS, A.; ARAÚJO, J.; MEDEIROS, S. G.; FERREIRA, L. The value of high-resolution anoscopy in the diagnosis of anal cancer precursor lesions in HIV-positive patients. **Arquivos De Gastroenterologia**, v. 48, n. 2, 2011.

GIRALDO, P.; JACYNTHO, C.; COSTA, C. et al. Prevalence of anal squamous intra-epithelial lesion in women presenting genital squamous intra-epithelial lesion. **European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology**, v. 142, n. 1, 2009.

HAZARD, K. Cutaneous Human Papillomaviruses [Thesis]. Malmo: Lund University; 2007.

HERÁCLIO, A. S.; ARAÚJO, T. A.; SOUZA, A. S. R. *et al.* Prevalência da lesão HPV induzida em canal anal de mulheres com neoplasia intraepitelial cervical 2 e 3: um estudo de corte transversal. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 37, n. 10, 2015.

HERÁCLIO, A. S.; SOUZA, A. S. P.; SOUZA, P. R. E. *et al.* Cross-sectional study of anal intraepithelial lesions in women with cervical neoplasia without HIV. **International Journal of Gynaecology and Obstetrics**, v. 140, n. 2, 2018.

HESSOL, N. A.; HOLLY, E. A.; EFIRD, J. T. *et al.* Anal intraepithelial neoplasia in a multisite study of HIV-infected and high-risk HIV-uninfected women. **AIDS**, v. 23, n. 1, 2009.

HOOTS, B. E.; PALEFSKY, J. M.; PIMENTA, J. H.; SMITH, J. S. Human papillomavirus type distribution in anal cancer and intraepithelial lesions. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 10, 2009.

HUSMAN, A. M. G. R.; WALBOOMERS, J. M.; VAN, D. B. A. J.; MEIJER, C. J.; SNIJDERS, P. J. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. **Journal of General Virology**, v. 76, n. 4, 1995.

INCA-INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL). **Estimativas 2015**: Incidência de câncer anal. 2015.

Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde. Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2015. [acesso 2017 Dez 13]. Disponível em: [<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>].

ISLAMI, F.; FERLAY, J.; TIEULENT, J. L.; FREDDIE BRAY, F.; JEMAL, A. International trends in anal cancer incidence rates. **International Journal of epidemiology**, v. 46, n. 6, 2016.

JAY, N. Elements of an anal dysplasia screening program. **Journal of the Association of Nurses in AIDS Care**, v.22, n. 6, 2011.

JIN, X. J.; CAI, P. S.; ZHU, S. P.; WANG, L. J.; ZHU, H. Negative correlation between X-linked inhibitors of apoptosis and second mitochondria-derived activator of caspase expression levels in cervical carcinoma and cervical intraepithelial neoplasia. **Oncology letters**, v. 14, n. 5, 2017.

JOHNSON, G. E.; NGUYEN, M. L.; KRISHNAMURTI, U.; SEYDAFKAN, S.; FLOWERS, L.; EHDAIVAND, S.; MOSUNJAC, M. Cytology as a screening tool for anal squamous intraepithelial lesion for HIV positive men: 10-year experience in an inner city hospital. **Journal of the American Society of Cytopathology**, v. 5, n. 3, 2015.

JOSEFSSON, A. M.; MAGNUSSON, P. K.; YLITALO, N. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. **Lancet**, v. 355, n. 9222, 2000.

KARLSEN, F.; KALANTARI, M.; JENKINS, A. Use of Multiple PCR Primer Sets for Optimal Detection of Human Papillomavirus. **Journal of clinical microbiology**, v.34, n. 9, 1996.

LAM, J. M.; HOCH, J. S.; TINMOUTH, J.; SANO, M.; RABOUD, J.; SALIT, I. E. Cost-effectiveness of screening for anal precancers in HIV-positive men. **AIDS**, v. 25, n. 5, 2011.

MAIA, L. B.; MARINHO, L. C.; WANDERLEY, P. B. T.; BATALHA, F. E. S, RIBEIRO, V. L. F.; COSTA, G. A comparative study between conventional and liquid-based cytology in screening for anal intraepithelial lesions in HIV-positive patients. **Diagnostic Cytopathology**, v. 42, n. 10, 2014.

MANOS, M. M.; TING, Y.; WRIGHT, D. K, et al. Use of Polymerase Chain reaction Amplification for the Detection of Genital Human Papillomaviruses. **Cancer Cells. US Patent Office**, v. 7, 1989.

MIN, K. J.; LEE, J. K.; SO, K. A.;KIM, A. K. Association between passive smoking and the risk of cervical intraepithelial neoplasia 1 in korean women. **Journal of epidemiology**, 2017.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews**, v. 10, n. 8, 2010.

MOSCICKI, A. B.; DARRAGH, T. M.; BERRY-LAWHORN, J. M.; et al. Screening for anal cancer in women. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, v. 19, n. 3, 2015.

NELSON, R. A.; LEVINE, A. M., BERNSTEIN, L.; SMITH, D. D.; LAI, L. L. Changing patterns of anal canal carcinoma in the United States. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 12, 2013.

NELSON, V. M.; BERSON, A. B. Epidemiology of Anal Canal Cancer. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 67, n. 1, 2017.

PAI, S. I. Mission impossible: How HPV-associated head and neck cancers escape a primed immune response. **Oral Oncology**, v. 49, n. 8, 2013.

PALEFSKY, J. M.; HOLLY, E. A.; GONZALES, J.; BERLINE, J.; AHN, D. K.; GREESNPAN, J. S. Detection of human papillomavirus DNA in anal Intraepithelial neoplasia and anal cancer. **Cancer Research**, v. 51, n. 3, 1991.

PALEFSKY, J. M.; HOLLY, E. A.; RALSTON, M. L, ARTHUR, S. P.; HOGEBOM, C. J.; DARRAGH, T. M. Anal cytological abnormalities and anal HPV infection in men with Centers for Disease Control group IV HIV disease. **Genitourinary Medicine**, v. 73, n. 3. 1997.

QIAGEN. QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook, fev. 2015. Disponível em < <https://www.qiagen.com/be/resources/resourcedetail?id=67893a91-946f-49b5-8033-394fa5d752ea&lang=en>>. Acesso em: 15 agosto, 2016.

ROURA, E.; CASTELLSAGUÉ, X.; PAWLITA, M. et al. Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: results from the EPIC cohort. **International Journal of Cancer**, v. 135, n. 2, 2014.

SASAGAWA, T.; TAKAGI, H.; MAKINODA, S. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. **Journal of Infection and Chemotherapy**, n. 18, v. 6, 2012.

SHRIDHAR, R.; SHIBATA, D.; CHAN, E.; THOMAS, C. R. Anal cancer: current standards in care and recent changes in practice. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 2, 2015.

SIEGEL, M. P. H.; REBECA, L.; KIMBERLY, D.; MILLER, M. P. H.; AHMEDIN, J. D. V. M. Cancer statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, 2017.

SIEGENBEEK, H. M. L.; MARRA, E.; VRIES, H. J. C.; SCHIM, L. M. F.; PRINS, J. M. Risk factors for anal high-grade squamous intraepithelial lesions in hiv-positive msm: is targeted screening possible?. **AIDS**, v. 31, n. 16, 2017.

SILVA, E. R.; MACÊDO, F. L. S.; SOARES, L. R. C.; ROSAL, V. M. S.; CARVALHO, N. A. L.; ROCHA, M. G. L. Diagnóstico molecular do papilomavírus humano por captura híbrida e reação em cadeia da polimerase. **Revista Femina**, v. 43, n. 4, 2015.

SILVA, I. T. C.; GIMENEZ, F. S.; GUIMARÃES, R. A. G.; CAMELO, R. T.; MELO, M. N. D.; BARROS, F. S.; DAUMAS, A.; CABRAL, C. R. B.; GUIMARÃES, E. L. Citologia anal como método de rastreamento para a detecção precoce do câncer anal: esfregaços com algodão hidrófilo são mesmo insatisfatórios? **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 1, 2005.

SIMPSON, S.; BLOMFIELD, P.; CORNALL, A. *et al.* Front-to-back & dabbing wiping behaviour post-toilet associated with anal neoplasia & HR-HPV carriage in women with previous HPV-mediated gynaecological neoplasia. **Cancer Epidemiology**, v. 42, 2016.

SPIESS, P. E.; DHILLON, J.; BAUMGARTEN, A. S.; JOHNSTONE, P. A.; GIULIANO, A. R. Pathophysiological basis of human papillomavirus in penile cancer: Key to prevention and delivery of more effective therapies. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 6, 2016.

STIER, E. A.; SEBRING, M. C.; MENDEZ, A. E.; BA, F. S.; TRIMBLE, D. D.; CHIAO, E. Y. Prevalence of anal human papillomavirus infection and anal HPV-related

disorders in women a systematic review. **American Journal of Obstetrics e Gynecology**, v. 213, n. 3, 2015.

TAMIM, H.; FINAN, R. R.; SHARIDA, H. E. *et al.* Cervicovaginal coinfections with human papillomavirus and *Chlamydia trachomatis*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 43, n. 4, 2002.

TONG, W. W.; HILLMAN, R. J.; KELLEHER, A. D.; GRULICH, A. E.; CARR, A. Anal intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma in HIV-infected adults. **HIV Medicine**, v. 15, n. 2, 2014.

TORRE, L. A.; BRAY, F.; SIEGEL, R. L.; FERLAY, J.; LORTET, T. J.; JEMAL, A. Global cancer statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 2, 2015.

TUPE, C. L.; PHAM, T. V. Anorectal complaints in the emergency department. **Emergency medicine clinics of North America**, v. 34, n. 2, 2016.

VAN, D. W. P.; VAN, L. E.; WOLFFS, P.; VAN, D. B. I.; FELTKAMP, M.; DE MELKER, H.; *et al.* Correlation between viral load, multiplicity of infection, and persistence of HPV16 and HPV18 infection in a Dutch cohort of young women. **Journal of Clinical Virology**, v. 83, 2016.

WALHART, T. Human papillomavirus biology, pathogenesis, and potential for drug discovery: A literature review for HIV nurse clinical scientists. **Journal of the Association of Nurses in AIDS Care**, v. 26, n. 6, 2015.

WANG, X.; TIAN, X.; LIU, F. Detection of HPV DNA in esophageal cancer specimens from different regions and ethnic groups: a descriptive study. **BMC Cancer**, v. 10, n. 19, 2010.

WANG, Z.; HU, L.; JIN, X.; LI, X.; XU, L. Evaluation of postoperative anal functions using endoanal ultrasonography and anorectal manometry in children with congenital anorectal malformations. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 51, n. 3, 2015.

WASSERBERG, N.; NUNOO-MENSAH, J. W.; GONZALEZ-RUIZ, C. *et al.* Colorectal cancer in HIV-infected patients: a case control study. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 22, n. 10, 2007.

WELTON, M. L.; SHARKEY, F. E.; KAHLENBERG, M. S. The etiology and epidemiology of anal cancer. **Surgical Oncology Clinics of North American**, v. 13, n. 2, 2004.

ZAPIEN, D. M.; RUIZ, F. X.; POIRSON, J.; MITSCHLER, A.; RAMIREZ, J.; FORSTER, A. Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53, **Nature**, v. 529, n. 7587, 2016.

SILVA, B. M. F.; CHAGAS, B. S.; GUIMARÃES, V. *et al.* HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 4, 2009.

SILVA, A. M. T. C.; AMARAL, A. M. V. T.; CRUZ, A. D. HPV e Câncer: O papel do papiloma vírus humano na carcinogênese. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.29, p. 48-54, 2006.

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 1, 2007.

MOSCICKI, A.; HILLS, N.; SHIBOSKI, S. *et al.* Risks for Incident Human Papillomavirus Infection and Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Development in Young Females. **JAMA**, v. 285, n. 23, p. 2995-3002, 2001.

BARCELLOS, L. P.; RUSSOMANO, F.; COUTINHO, J. R. H. Value of conventional cytology in the presence of macroscopic lesions of the anal canal. **Journal of coloproctology**, v. 34, n. 1, 2014.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARTECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS – RESOLUÇÃO 466/12)

O presente termo refere-se a um convite a Sra. _____ à participar da pesquisa intitulada: “GENOTIPAGEM PARA O HPV EM PACIENTES COM NEOPLASIAS INTRAEPITELIAIS ANAIS”. A pesquisa será realizada pelo Biomédico Arthur Hipólito Pereira Leite e pelo professor Dr. Mario Ribeiro de Melo-Junior, contatados pelo telefone (83) 998039795, e-mail: arthur.hipolito@hotmail.com, ou pelo endereço profissional: Departamento de Patologia, situado no prédio da Pós-Graduação do centro de Ciências da Saúde (CCS) – térreo, Avenida da Engenharia s/nº - Cidade Universitária – CEP: 50740 – Recife – PE, Fone/Fax: (81) 2126.8529.

A pesquisa será realizada através do exame de anuscopia. O exame anal tem o objetivo de observar o interior do ânus através da introdução do anuscópio, instrumento rígido em forma de espéculo (semelhante à forma de um tubo), lubrificado, que permite a avaliação do ânus, tendo a finalidade de verificar a existência de lesões pré-cancerosas ou cancerosas, onde na presença de “manchas”, será realizado a retirada de um pequeno fragmento sob anestesia, para realização de biópsia. Com relação aos riscos, a realização dos exames apenas provoca desconforto, quanto à introdução dos instrumentos ou mesmo a picada da agulha da anestesia. Os participantes da pesquisa serão beneficiados, pois os procedimentos realizados são necessários tendo em vista a possibilidade de cura, caso seja detectado alguma lesão pré-cancerosa. No caso da existência de lesão pré-cancerosa ou câncer, a paciente será tratada pelos médicos do Serviço de Pélvis do Hospital de Câncer do Recife. Não haverá nenhum incentivo financeiro pela participação na pesquisa, sendo esta com finalidade exclusiva de colaborar para o sucesso da pesquisa com objetivos estritamente acadêmicos. A participação na pesquisa poderá ser interrompida, se assim desejar, sem sofrer nenhum constrangimento ou qualquer prejuízo para o seu tratamento, seja tratamento clínico ou cirúrgico.

As informações oferecidas pela participante serão submetidas às normas de ética em pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde. Em caso de dúvida poderá contatar ainda com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Pernambuco, situado na Avenida Cruz Cabugá, 1597 - Santo Amaro Recife - PE, 50040-971. A identidade do participante será mantida em sigilo e os resultados da pesquisa poderão ser apresentados em eventos e publicações científicas. O pesquisador disponibilizará uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme recomendações da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Assim se a Sra. aceitar o convite para participar da pesquisa, por favor, preencha os espaços abaixo:
Eu, _____, RG _____,
fui devidamente esclarecida do projeto de Pesquisa acima citado e aceito o convite para participar.

Recife, _____ de _____ 20____.

Testemunhas

1 _____

2 _____

Assinatura da pesquisadora _____

Assinatura do pesquisado _____

APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO SOBRE INFORMAÇÕES SOCIOECONÔMICAS E CLÍNICAS

QUESTIONÁRIO N° _____

DADOS PESSOAIS

Data de coleta: ____/____/____

Nome: _____

Idade: _____

Data de Nascimento: ____/____/____

Registro: _____

VIDA SEXUAL

Nº de parceiros _____

Intercurso anal () SIM () NÃO

Uso de preservativo durante intercuro anal () SIM () NÃO

DADOS CLÍNICOS

HIV _____

Diagnosticado em ____/____/____

Doença auto-imune? () SIM () NÃO

() Lúpus eritematoso () Artrite reumatoide () Doença de Crohn/Retocolite

() Esclerose múltipla () Psoríase

Já fez ou faz uso de imunossupressor? () SIM () NÃO

Quando _____

Quanto tempo _____

Infecção por HPV () SIM () NÃO

Sítios

() **Anal**

Tipo () condiloma () NIA I () NIA II () NIA III

() **Perianal**

Tipo () condiloma () NIPA I () NIPA II () NIPA III

() **Vulvar**

Tipo () condiloma () NIV I () NIV II () NIV III

() **Vaginal**

Tipo () condiloma () NIVA I () NIVA II () NIVA III

() **Cervical**

Tipo () condiloma () NIC I () NIC II () NIC III

Tratamento () SIM () NÃO

Tipo de tratamento

() Medicamentoso () Imiquimod () Interferon () Ácido tricloroacético
() Podofilina () Podofilotoxina () Cirúrgico

Recidiva () SIM () NÃO

Tratamento do parceiro () SIM () NÃO

Outras infecções

() Chlamydia trachomatis () Gardnerella sp () Candida sp

() Herpes simplex vírus () Neisseria gonorrhoeae () Outras _____

HÁBITOS

Alcoolismo

() SIM () NÃO

Quanto tempo _____

Frequência

() Dia () Semana () Mês

Tabagismo

() SIM () NÃO

Quanto tempo _____

ANUSCOPIA DE MAGNIFICAÇÃO (Observação Clínica):

LAUDO HISTOPATOLÓGICO:

ANEXO A – PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DO SISTEMA IMUNE INATO E DE PROLIFERAÇÃO EPITELIAL NAS MUCOSAS CERVICAL E ANAL DE PACIENTES INFECTADOS PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Pesquisador: Maria Juliana Galvão Nunes

Área Temática: Área 1. Genética Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 2

CAAE: 06938812.0.0000.5205

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: Parecer consubstanciado

Justificativa: No parecer o detalhamento da apresentação do projeto que consta refere-se a outro

Data do Envio: 11/06/2013

Situação da Notificação: Aguardando revisão do parecer do colegiado

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 301.040

Data da Relatoria: 11/06/2013

Apresentação da Notificação:

O Câncer Cervical e o Anal apresentam como um dos fatores de risco mais importante a infecção crônica pelo HPV, esta resulta em uma proliferação aumentada do epitélio escamoso, sendo assim a avaliação de um marcador de proliferação celular KI 67, é útil no prognóstico de uma variedade de tumores. Serão coletadas amostras cervicais e anais de pacientes submetidos a colposcopia e anoscopia estas amostras coletadas com escovinhas ginecológicas para identificação do DNA e análise da expressão da molécula.

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3217-8197

Fax: (81)3217-8197

E-mail: cep@hcp.org.br

**SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC**



Continuação do Parecer: 361.040

Objetivo da Notificação:

Criação de uma base de dados local, com informações sobre mulheres com infecção cervical e/ou anal provocada pelo Papilomavírus humano (HPV) atendidas no Hospital de Câncer de Pernambuco.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A execução da pesquisa não implicará em nenhum risco para os pacientes nesta envolvidos. A realização dos exames pode provocar apenas desconforto e/ou dor pela anestesia ou introdução do instrumento (espelho ou anoscópio), pode haver constrangimento durante realização dos mesmos, devido a posição para execução do procedimento. Não existe nenhum incentivo financeiro ao participante, sendo assim o objetivo é colaborar com os dados, exclusivamente, acadêmicos.

Benefícios:

Os benefícios pela participação na pesquisa é que os procedimentos realizados são necessários tendo em vista a possibilidade de cura, caso seja detectado alguma lesão pré-cancerosa. No caso da existência de lesão pré-cancerosa ou câncer, a paciente será tratada pelos médicos do Serviço de Pélvis do Hospital de Câncer do Recife, independente da participação no projeto

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

O objetivo do presente estudo será avaliar a presença de HPV, proliferação epitelial e a expressão de moléculas do sistema imune inato em amostras cervicais e anais de mulheres HIV negativo. Metodologia: Serão coletadas amostras cervicais e anais de pacientes submetidas à colposcopia e anoscopia de magnificação de pacientes atendidas no Hospital de Câncer de Pernambuco. As amostras coletadas no Hospital de Câncer de Pernambuco serão processadas e analisadas no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami/LIKA/UFPE.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos estão de acordo com a resolução 196/96 da CNRM.

Recomendações:

Recomenda-se que seja retirado a frase que não haverá risco, para RISCO MINIMO.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As alterações nos riscos, critérios de exclusão e TCLE foram realizadas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3217-8187

Fax: (81)3217-8187

E-mail: csp@hcpq.org.br

**SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC**



Continuação do Formon: 361.040

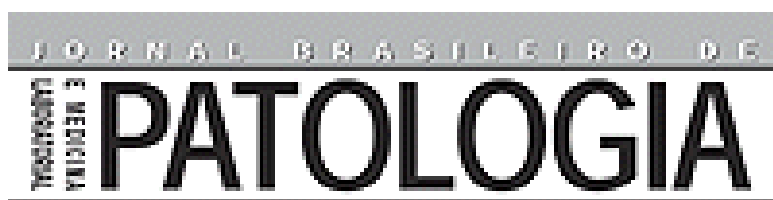
Considerações Finais a critério do CEP:

RECIFE, 11 de Junho de 2013

Assinado por:
ISABEL CRISTINA LEAL
(Coordenador)

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597
Bairro: Santo Amaro CEP: 50.040-000
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)3217-8187 Fax: (81)3217-8187 E-mail: cep@hquang.br

ANEXO B – INSTRUÇÕES PARA AUTORES



Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial (JBPML), a continuation of Jornal Brasileiro de Patologia, which is published bimonthly (February, April, June, August, October and December), is an official organ of Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML), Sociedade Brasileira de Patologia (SBP) and Sociedade Brasileira de Citopatologia, indexed at Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), at Periódica and at Chemical Abstracts. It is also a member of the Scientific Electronic Library Online (ScieELO) database. It is aimed at the publication of scientific papers that contribute to the development of Laboratory Medicine and it accepts the following text categories: original, review, and experimental articles; case reports, brief communications and letters to the editor. The papers may be submitted in Portuguese, English or Spanish.

Analysis of the articles

The received manuscript will be sent to at least two independent evaluators, well-known scientific pairs with expertise in the area discussed in the article. After their analysis, the chief editor of JBPML will contact the main author to inform the steps to be followed for publication or its ultimate rejection.

Copyright

The authors must send a term of responsibility formally stating the authorship of the text and the copyright transfer. The publication management system of JBPML has a model of this document and the instructions to fill it in and send it.

Ethics

Studies carried out with human beings, including organs and/or isolated tissues as well as clinical records, must be according to the standards 196/96 of the National Health Council (<http://www.bioetica.ufrgs.br/res19696.htm>). Papers to be published shall be accompanied by the ethics committee certificate from the institution where research has been carried out, in accordance with the Helsinki Declaration, 1989 (<http://www.bioetica.ufrgs.br/helsin4.htm>). In the experimental investigations

involving animals, the ethical principles of animal experiments stated by Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) and the standards established by the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, Washington, DC, 1996) must be respected. The drugs and chemical substances used in the research must be precisely identified.

Names or patient's initials, business names, companies and hospital records must not be used.

Abstracts and key words

Regardless of the language in which the article was written, there must be two abstracts: one in Portuguese and another one in English. The abstracts must identify the objectives, procedures and conclusions of the research (maximum of 250 words for original, review and update articles; and maximum of 100 words for case reports and brief communications). If the article is in Spanish, there should also be an abstract in Spanish. The key words, which represent the subject discussed in the article, must be within three to six, using controlled vocabulary Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) of BIREME, with other terms when necessary. They must be presented in Portuguese and English. If the article is written in Spanish, the key words should also be in that language.

Acknowledgements

They must be brief, objective and directed to the person or institution that contributed considerably to the elaboration of the research. They must be included after the conclusion and before the bibliographic references.

Structure of the text

Original

articles

They are intended to report the original unpublished research results that may be replicated and generalized. The articles may have a maximum of 4 thousand words. The formal structure must follow the presentation structure of this kind of article: Introduction, Objectives, Material and Method, Results, Discussion, Conclusions and References. The use of subtitles is recommended, particularly in Discussion. Clinical implications and study limitations must be clearly stated. The topic Material and Method should be thoroughly detailed. In these articles, the presentation of a structured abstract in Portuguese and English is required with the formal presentation of the article: Introduction, Objectives, Material and Method, Results, Discussion, Conclusions and References. The abstract in English must be preceded by the title in English. The references must be at the end of the text according to the following standards.

Brief

communications

They are short reports that must present: 1) preliminary study data with suggestive findings that guarantee a more definite investigation; 2) replication studies; and 3) negative studies of important topics. These articles must have a maximum of 1,500

words, including non-structured abstract, one table or image at most, as well as the References.

Review

articles

Review articles will be accepted by means of an invitation. They are systematized critical evaluation of the literature about a certain topic, which must state conclusions and have up to 5 thousand words. The organization of the article is up to the author, apart from Introduction, Discussion and Conclusion. A structured abstract of the text in its original language and another one in English are required. An extensive list of references must appear at the end of the text.

Update

articles

They are descriptive and interpretative texts based on the recent literature about the global situation in which a certain topic is found. It must have a maximum of 3 thousand words. The structure of the text is decided by the author, but it must contain a non-structured abstract in the original language and another one in English, as well as the references.

Case

reports

They are original clinical-laboratory observations followed by analysis and discussion. They must have up to 1,500 words. The structure must present at least the following topics: Introduction, Case reports, and Discussion. Include a non-structured abstract in the original language and another one in English.

Letters

to

the

Editor

They are letters that aim at discussing the recent articles published in the magazine or reporting original research or relevant scientific findings. Brief letters with a maximum of 500 words (including bibliography, no tables and pictures) will be considered if the sentence "for publication" is explicit.

References

Bibliographic references must appear at the end of the article in numbered alphabetical order. They must follow the standards of Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) - NBR-6023 (August 2000). The journal titles must be referred in the abbreviated form according to Index Medicus (List of Journals Indexed in Index Medicus). If the references do not follow the adopted standards, the articles will be immediately rejected without content review. The authors must make sure that the references quoted in the text are included in the bibliography with exact dates and authors' names accurately written. The preciseness of bibliography is the authors' responsibility. Personal communications, original or in progress texts may be cited when absolutely necessary, but they cannot be included in the references, just mentioned in the text or in a footnote. The references must follow the examples below.

Examples:

- Journal articles (just one author)
COTRIM, F. L. S. Coleta de sangue para dosagem de triglicerídeos. J Bras

- Patol, v. 33, n. 4, p. 201-02, 1997.
- Journal articles (more than three authors)
ABREU, E. S. *et al.* Doença de Hodgkin infanto-juvenil no estado do Ceará e sua relação com o vírus Epstein-Barr: parâmetros clínicos e análise morfológica imuno-histoquímica e por hibridização in situ. J Bras Patol, v. 33, n. 4, p. 178-84, 1998.
 - On-line journal article
YAZLE, J. S. R. *et al.* Assistência hospitalar como indicador da desigualdade social. Rev Saúde Publ, São Paulo, v. 31, n. 5, 1997. Available at: <http://www.fsp.usp.br/rsp>. Accessed on: 23 mar. 1998.
 - Books (two authors)
RINGSVEN, M. K.; BOND, D. Gerontology and leadership skills for nurses. Albany, N.Y.: Delmar Publishers, 1996.
 - Chapter or part of a book published by another author
SCIVOLETO, R. Sistema nervoso autônomo. In: ZANINI, A. C.; OGA, S. *Farmacologia aplicada*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1989. Cap. 9; p. 97-141.
 - Part of a book on electronic media
SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. *Tratados e organizações ambientais em matéria de meio ambiente*. In: _____. Entendendo o meio ambiente. São Paulo, 1999. v. 1. Available at: <http://www.bdt.org/sma/entendendo/atual/htm>. Accessed on: 8 mar.1999.
 - Event on electronic media
SILVA, R. N.; OLIVEIRA, R. *Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total da educação*. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPE, 4., 1996, Recife. *Anais eletrônicos...* Recife: UFPe, 1996. Available at: <http://www.propesq.ufpe.br/anais/educ/ce04.htm>. Accessed on: January 21, 1997.
 - Thesis or dissertation
OLIVEIRA, C. M. *Isolamento e caracterização de estreptococos de placa dental*. Rio de Janeiro, 1974. Tese (doutoramento) - Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
 - Quotations in the text
They must be identified by Arabic numbers (index numbers).
The author's name and the year may be included. The bibliography with more than one author must contain the first author's surname followed by the expression *et al.* For example: Higash *et al.*

Tables and images

The tables must be numbered consecutively in Arabic numbers and headed with a title. The same data should not be repeated. The tables should follow the standards of tabular presentation established by the National council of Statistics and published by Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 1993). The illustrations (graphs, photos, drawings, etc.) must be numbered consecutively in Arabic numbers and cited as figures. They should be sufficiently clear to allow reproduction. The graphs must be prepared in a graph processing system. The approximate places where the illustrations will be intercalated as figures in the text must be indicated.

We accept tables, images and graphs in the following electronic file formats: jpg, gif, psd, tif and png.

Abbreviations and medicine names

The abbreviations must be indicated in the text. Use the generic name of medicines and indicate the source of substances not available for prescription. The units of measure as well as abbreviations must be expressed in the decimal metric system and, if the author wishes, in the International in parentheses.

Contact with JBPML

Sociedade	Brasileira	de	Patologia	Clínica/Medicina	Laboratorial
Tel.:			(21)		3077-1400
e-mail:	jbpml@sbpc.org.br				