

**MARIA DAS GRAÇAS DE FÁTIMA CAVALCANTE
CASTOR**

**LESÕES PROVOCADAS PELO HPV EM MUCOSAS
ANOGENITAL EM PACIENTES HIV NEGATIVAS**

RECIFE

2011

**MARIA DAS GRAÇAS DE FÁTIMA CAVALCANTE
CASTOR**

**LESÕES PROVOCADAS PELO HPV EM MUCOSAS
ANOGENITAL EM PACIENTES HIV NEGATIVAS**

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-Graduação em
patologia do Centro de Ciência da
Saúde – UFPE linha de pesquisa:
Patologia e Epidemiologia das
Doenças Neoplásicas e do
Desenvolvimento para obtenção do
título de mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto José Vieira de Mello

RECIFE

2011

Castor, Maria das Graças de Fátima Cavalcante
Lesões provocadas pelo HPV em mucosas
anogenital em pacientes HIV negativas / Maria das
Graças de Fátima Cavalcante Castor. – Recife: O
Autor, 2011.

134 folhas: il., fig.; 30 cm.

Orientador: Roberto José Vieira de Mello

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal
de Pernambuco. CCS. Patologia, 2011.

Inclui bibliografia, anexos e apêndices.

1. Colo do útero. 2. Vagina. 3. Canal anal. 4.
HPV. 5. Neoplasia intra-epitelial anal. I. Mello,
Roberto José Vieira de. II. Título.

616.951 8

CDD (20.ed.)

UFPE

CCS2011-168

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

R E I T O R

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE- REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

D I R E T O R DO CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE

Prof. José Thadeu Pinheiro

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof. Adriana Maria da Silva Telles

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Hilton Justino da Silva

R E C I F E

2011



**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Patologia**

Av. Prof. Moraes Rego s/n - 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.pgmap@ufpe.br> <http://www.pospat.ufpe.br>



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

AUTORA: MARIA DAS GRAÇAS DE FÁTIMA CAVALCANTE CASTOR

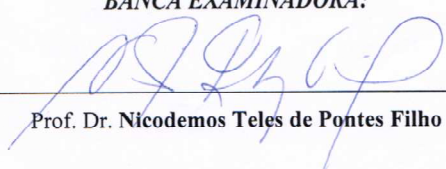
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA

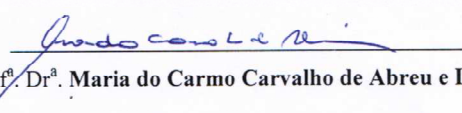
**NOME DA DISSERTAÇÃO: "LESÕES PRODUZIDAS PELO HPV EM MUCOSAS
ANOGENITAL EM PACIENTES HIV NEGATIVAS"**

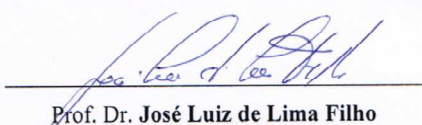
ORIENTADOR: DR. ROBERTO JOSÉ VIEIRA DE MELLO

DATA DA DEFESA: 27 DE MAIO DE 2011.

BANCA EXAMINADORA:


Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho


Prof.ª Dr.ª Maria do Carmo Carvalho de Abreu e Lima


Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me prover de saúde, oportunidade e sabedoria para desenvolver meu crescimento de vida durante os dois anos do mestrado e sua conclusão, com seus percalços, descobertas, novas amizades e a consciência de enxergar o mundo sob novas perspectivas. Um especial agradecimento à minha madrinha Nossa Senhora das Graças, por me fornecer alívio espiritual nas horas de aflição e com seu manto me acalantar me fornecendo forças para seguir sempre em frente e chegar ao termino do que eu me propus a realizar.

À meus pais: Nemésio Castôr Falcão (*in memorium*) e minha amada mãe Benilde Cavalcante Castor (*in memorium*) cujo exemplo de vida , honradez, força, amor e amizade continua me guiando em todos os meus momentos.

À minha muito querida irmã Francisca Maria da Conceição Castor, o meu muito obrigado pelo apoio, inspiração, tolerância e por sempre estar ao meu lado com sua amizade, nesse às vezes doloroso processo de crescimento.

Ao meu orientador Roberto José Vieira de Mello meu especial obrigado por aceitar ser meu orientador e pelo apoio durante o mestrado.

Aos professores: Nicodemos Teles de Pontes Filho e Hilton Justino da Silva minha gratidão pelo apoio, disponibilidade em ajudar e preciosas orientações.

Aos colegas do mestrado meu muito obrigado, pela amizade e por fornecer preciosos conhecimentos de informática.

Ao Serviço de Pélvis do Hospital de Câncer de Pernambuco na pessoa de Norma Bastos de Andrade por permitir a realização da minha pesquisa e em particular a minha amiga e colega Maria Rosa Coelho de Albuquerque pelo cuidado em direcionar as suas pacientes para compor a minha pesquisa.

À Michele Gomes da Silva e Crismélia Martins Silva (Cris) meu obrigado pelo suporte na realização dos exames e a todos os funcionários do serviço de Pélvis que de alguma maneira contribuíram para minha pesquisa.

Ao departamento de Patologia, o meu muito obrigado na pessoa de Dr. Adônis Reis Lira de Carvalho por permitir o fornecimento dos blocos histológicos para realização da pesquisa e a Dra. Maria do Carmo Abreu e Lima pelo apoio dentro do departamento e por aceitar participar da banca de defesa.

Agradeço a boa vontade e o empenho de Alzira de Melo Machado, Rosimeri Maria da Silva (Rose), Marlene Roque de Sena Oliveira, Márcia Maria Clemente, Ana Carla Bezerra dos Santos Rocha e todos que compõe o departamento de Patologia do Hospital.

Obrigado à Solange Pereira Alves do departamento de Pesquisa do Hospital de Câncer pela colaboração.

À Carmelita de Lima Bezerra Cavalcanti nosso obrigado pelos cortes dos blocos parafinados.

Ao Laboratório de imunopatologia Keizo Asami (LICA) meu muito obrigado na pessoa de José Luiz de Lima Filho e Danyelly Bruneska pela cooperação e empenho na realização dos exames.

Aos meus pacientes um muito obrigado pela cooperação e por ser um constante estímulo a minha procura por conhecimento.

RESUMO

O papillomavirus humano (HPV) é o principal causador do câncer cervical e também está associado com o desenvolvimento do câncer anal e vaginal. A vagina é um órgão que, devido a sua topografia, encontra-se em estreita relação com o colo de útero, e por isto, sujeito a infecção pelo HPV. O câncer vaginal é extremamente incomum e o de menor frequência na mulher, em torno de 1% das neoplasias malignas do trato genital feminino. O câncer de canal anal também pode ser considerado incomum, e sua incidência na população geral atinge em torno de 1,5% dos tumores do sistema digestivo inferior e 2% a 4% entre os tumores colorretais. Apesar disso, o câncer anal vem nos últimos anos apresentando um aumento progressivo de sua incidência, principalmente no sexo feminino. Trabalhos científicos onde o canal anal seja o foco ainda são poucos, principalmente quando se refere a mulheres imunocompetentes. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi pesquisar sobre as lesões provocadas pelo HPV no canal anal de mulheres negativas para o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) e portadoras da neoplasia intra-epitelial cervical grau 3 (NIC3) ou vaginal grau 2 (NIVA2). Foram avaliadas 122 mulheres voluntárias, onde 114 tinham NIC3 e 08 NIVA2. No caso de detecção de lesão anuscópica pelo exame de anuscopia de magnificação, realizou-se biópsia do tecido anal para diagnóstico histológico e análise molecular para o HPV. Os resultados histológicos do canal anal mostraram a neoplasia intra-epitelial grau 1 (NIA1) em 20,2%, NIA2/3 9,5% e a presença do HPV em 9,4% das amostras. A análise molecular destas amostras foi positiva em 12,2%, 5,4% e 6,8% respectivamente; enquanto nas amostras de NIC3 e NIVA2 obtivemos 27,2% e 75% de positividade. Tais dados sugerem que o HPV seja responsável pelas lesões pré-malignas do canal anal, cervical e vaginal possivelmente pela circulação viral nestas regiões.

Palavras-Chaves: Colo do útero, Vagina, canal anal, HPV, neoplasia intra-epitelial anal

ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) is the main cause of cervical cancer and is also associated with the development of anal cancer and vaginal cancer. The biological similarity of cervical and anal cancer includes its etiology related to HPV. The vagina is an organ that its topography is closely related to the cervix, and therefore subject to HPV infection. Vaginal cancer is extremely rare and less frequent in women, being around 1% of malignancies of the female genital tract. Anal cancer is also unusual, and its incidence in the general population reaches about 1.5% tumors of the lower digestive system and 2% to 4% colorectal tumors among. Despite this, anal cancer has showed a progressive increase in its incidence, especially in females. Scientific papers focused in anal canal are still rare, especially when it comes to immunocompetent women. Our objective was to analysis the anal lesions caused by HPV in women negative for human immunodeficiency virus (HIV) and carriers of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3) or vaginal grade 2 (VAIN2). We evaluated 122 women volunteers, where 114 and 08 had CIN3 and VAIN2. For women with the presence of anoscopy lesion, it was performed biopsy from the anal tissue for histological and molecular analysis for HPV. The histological results showed the presence of intraepithelial neoplasia grade 1 (AIN1) 20.2%, AIN2/3 9.5 % and the presence of HPV in 9.4% of samples. The molecular analysis of these samples was positive in 12.2%, 5.4% and 6.8%, respectively; while in samples of CIN3 and VAIN2 got 27.2% and 75.0% positive. These data suggest that HPV is responsible for pre-malignant lesions of the anal canal, possibly due to cervical and vaginal viral circulation in regions.

Key Words: uterine cervix, vagina, anal canal, HPV, anal intraepithelial neoplasia

LISTA DE TABELAS

Artigo de revisão sistemática: HPV and pre-cancerous lesions of anal canal in women: Systematic review	20
Tabela 1 - Publications between 1966 and 2010 about HPV-induced lesions in the anal canal in HIV-negative women.	34
Artigo original: Lesões provocadas pelo HPV em mucosas anogenital em pacientes HIV negativas	
Tabela 1 - Componentes e volumes utilizados na amplificação da região L1-HPV.	57
Tabela 2 - Características etárias e sexuais das pacientes HIV negativas com diagnóstico de NIC3 e NIVA2 atendidas no ambulatório de Pélvis do Hospital do Câncer de Pernambuco no período de Agosto a Dezembro de 2009.	58
Tabela 3 - Histórico de condiloma genital e identificação molecular do papilomavírus humano em amostras cervicais e anais de mulheres HIV negativas com diagnóstico de NIC3, agrupadas por faixa etária.	60
Tabela 4 - Identificação molecular do papilomavírus humano em 114 mulheres com diagnóstico histológico de NIC3 e sua relação com o número de parceiros sexuais.	60
Tabela 5 - Diagnóstico anuscópico em 114 mulheres com diagnóstico de NIC3 e sua relação com a identificação molecular do papilomavírus humano.	61
Tabela 6 - Identificação molecular do papilomavírus humano de acordo com o resultado de histologia do canal anal das 68 mulheres também diagnosticadas com NIC3.	62
Tabela 7 - Identificação molecular do papilomavírus humano e sua relação com a prática de intercurso anal em 114 mulheres com diagnóstico de NIC3.	64
Tabela 8 - Análise molecular do papilomavírus humano em mulheres com diagnóstico histológico de NIVA2 e a relação com os resultados anuscópico.	65
Tabela 9 - Eficiência de identificação do papilomavírus humano pelos oligonucleotídeos MY09/11 e GP5+/6+ para as amostras de tecido cervical, anal e vaginal.	66

LISTA DE FIGURAS

Artigo de revisão sistemática: HPV and pre-cancerous lesions of anal canal in women: Systematic review	20
Figura 1 - Scheme showing the study selection process for systematic review of anal lesions caused by human papillomavirus in HIV-negative women based on online database sources.	35
Figura 2 - Photograph of magnified anoscopy in a patient in gynecological position, showing the transitional area of the anal epithelium with condyloma and varicose veins.	36
Figura 3 - Photograph of magnified anoscopy in a patient under gynecological position, showing an HPV-induced lesion evidenced by acetowhite epithelium. The arrow indicates the transitional area of the anal epithelium.	37
Artigo original: Lesões provocadas pelo HPV em mucosas anogenital em pacientes HIV negativas	52
Figura 1 - Lesão de pólipos de canal anal em visão no exame anuscópico; Lesão de mancha hiperocrômica em exame anuscópico.	61
Figura 2 - Lesão histológica de condiloma acuminado – material de canal anal.	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida humana
ADAT	Adenosina desaminase
ASIL	Lesão intra-epitelial anal de alto grau (High grade squamous intraepithelial)
AIN	Anal intraepithelial neoplasia
CIN	Cervical intraepithelial neoplasia
CAF	Cirurgia de alta frequência
EAB	Epitélio acetobranco
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
Genotipagem	Método que define o tipo viral do HPV
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida humana
HPV	Vírus do papiloma humano
HCP	Hospital de Câncer de Pernambuco
HE	Hematoxilina e eosina
HSIL	Lesão intra-epitelial de alto grau (High grade squamous intraepithelial lesion)
IFCPC	Federação Internacional de Patologia Cervical e Colposcopia (International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy)
LSIL	Lesão intra-epitelial de baixo grau (Low grade squamous intraepithelial lesion)
MSM	Men who have sex another man
NIC	Neoplasia intra-epitelial cervical
NIA	Neoplasia intra-epitelial anal
NIVA	Neoplasia intra-epitelial vaginal
NIV	Neoplasia intra-epitelial vulvar
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PapilloCheck®	Método utilizado na genotipagem do HPV

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Artigo de revisão	20
3 MÉTODOS	38
3.1 Tipo de estudo	39
3.2 Local do estudo, população alvo e período de referência	39
3.2.1 Local do estudo	39
3.2.2 População alvo e período de referência	39
3.3 Critérios de inclusão e exclusão para seleção de amostra	40
3.3.1 Critérios de inclusão	40
3.3.2 Critérios de exclusão	40
3.4 Métodos de coleta de dados	40
3.4.1 Coleta de dados	40
3.4.2 Procedimento na seleção da amostra	41
3.5 Definição das variáveis	42
3.5.1 Características demográficas	42
3.5.2 Característica da vida sexual	43
3.5.3 Característica do exame de canal anal	44
3.5.3.1 Lesão anal sugestiva no exame de anuscopia de magnificação	44
3.5.3.2 Lesão de canal anal evidenciado pela biopsia	45
3.5.4 Característica do exame cervical	46
3.5.4.1 Lesão cervical evidenciado pela biopsia	46
3.5.5 Características do exame vaginal	46
3.5.5.1 Lesão vaginal evidenciada pela biopsia	46
3.5.6 Papilomavírus humano (HPV)	46
3.5.6.1 Papilomavírus (HPV) em amostra cervical	48
3.5.6.2 Papilomavírus em amostra vaginal	48

3.5.6.3 <i>Papilomavírus em amostra de canal anal</i>	48
4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	48
RESULTADOS	51
ARTIGO ORIGINAL	52
CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
APÊNDICES	85
APÊNDICE A Formulário para coleta de dados	86
APÊNDICE B Termo de consentimento livre e esclarecido	88
APÊNDICE C Termo de autorização de uso de imagem	91
ANEXOS	93
ANEXO A Normas da <i>International Journal of Colorectal Diseases</i>	94
ANEXO B Comprovante de submissão do artigo	109
ANEXO C Normas da revista <i>Gynecologic Oncology</i>	110
ANEXO D Regulamentação de defesa e normas de apresentação	120
ANEXO E Aprovação do Comitê de Ética	134

APRESENTAÇÃO

1 APRESENTAÇÃO

A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) é considerada na atualidade a doença sexualmente transmissível mais freqüente na população sexualmente ativa (HOSSNE, 2008; BARZON et al., 2010).

Vários métodos de detecção viral como a microscopia eletrônica, imuno-histoquímica e a hibridização molecular foram utilizados para caracterizar as cepas de HPV, mais recentemente contamos com o PCR (Reação em cadeia da polimerase) e a Genotipagem (JACYNTHO, ALMEIDA FILHO e MALDONADO, 1994; LÓPEZ et al., 2010).

Atualmente as cepas do HPV somam 120 tipos, embora, somente em torno de 40 infectam as células epiteliais do trato genital inferior (NADAL e MANZIONE, 2007; SICHERO e VILLA, 2008; BERNARD, et al; 2010).

As cepas mais comuns de HPV foram agrupadas levando-se em consideração a frequência e a oncogenicidade das lesões anogenitais. Entre os do grupo de baixo risco oncogênico estão às cepas 6, 11, 42, 43 e 44 e no grupo de alto risco oncogênico os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68. Os HPV16 e 18 são os mais freqüentes; provocando 70% das lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau (HSIL), e no grupo de baixo risco os HPV6 e 11 se sobressaem, sendo responsáveis pelas lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau (LSIL) e 90% das verrugas anogenitais (KUMAN, 1994; NADAL e MANZIONE, 2006; SOARES, 2008; LÓPEZ et al., 2010).

O vírus HPV tem uma elevada prevalência em ambos os sexos, atingindo principalmente dois grupos etários, um constituído por jovens de até 25 anos e sexualmente ativos, que é o mais afetado. Neste grupo o contato inicial com a infecção pelo HPV, leva freqüentemente às infecções transitórias com queda gradual com a idade e está geralmente ligada ao grupo de baixo risco. O segundo grupo é constituído por indivíduos na quarta e quinta décadas de vida, onde ocorre o ressurgimento da infecção viral (HPV sai da fase de latência) devido à baixa na imunidade contra o vírus a que esteve exposto em idade mais jovem, ou surge uma nova infecção viral geralmente por um HPV oncogênico (ROSENBLANTT et al., 2005; RIBEIRO, 2008; ROTELI-MARTINS et al., 2011)

A persistência por longos períodos de infecção pelo HPV oncogênico, associada uma carga viral elevada ou a presença no mesmo indivíduo de diferentes cepas de HPV (co-infecção) são considerados fatores de risco para

desenvolver lesões pré-malignas de alto grau e câncer anogenital (ROSENBLANTT et al., 2005; NADAL e MANZIONE, 2006; ZAMPIROLO et al., 2007; RIBEIRO, 2008; CAMARGO et al., 2011).

O câncer do colo do útero é o segundo mais freqüente entre as mulheres em todo o mundo, correspondendo a 8,8% de todos os cânceres com mortalidade em torno de 8,2%, correspondendo a 275.008 mulheres (GLOBOCAN, 2011). No Brasil, a estimativa de casos de câncer do colo do útero para 2010 chegou a 7,28% no âmbito feminino, sendo 3,77% do total estimado para o território brasileiro (INCA, 2010).

Outros fatores são considerados importantes na epidemiologia do câncer do colo do útero, tais como: ambientais, dieta, tabagismo, nível socioeconômico, paridade, uso de anticoncepcionais orais, infecção pelo HIV, múltiplos parceiros, infecção por clamídia, baixa imunidade (transplantados) e genético como a história familiar (PALEFSKY e RUBIN, 2009; KAUSHIC et al., 2011).

Cerca de 80% das mulheres infectadas pelo HPV não apresentam sintomas clínicos, e em torno de 60 a 70% dos casos a infecção regride espontaneamente, portanto a preocupação reside nas infecções persistentes promovidas pelas cepas oncogênicas, que aumentam o risco de neoplasia intra-epitelial e do câncer (ZAMPIROLO et al., 2007; INSIGA et al., 2011).

O câncer do colo do útero é um dos principais fatores de risco para o câncer vaginal. Estudos epidemiológicos indicam que o câncer de vagina se assemelha ao câncer do colo e o DNA do HPV é detectado na maioria dos tumores vaginais e seus precursores. O câncer vaginal é raro, abrangendo apenas 1% das neoplasias malignas do trato genital feminino (ROBBIN e COTRAN, 2005; SHUKLA, et al., 2009).

A presença da infecção provocada pelo HPV, produzindo lesões similares nas regiões anal e genital pode ocorrer pela existência de um epitélio semelhante, escamoso estratificado, de origem embrionária comum (SANTOS, 2007) e sua presença no canal anal em mulheres é maior ou igual a infecção produzida pelo HPV em colo de útero (PALESFSKY, 2001; PALESFSKY, 2010).

O canal anal está situado no final do intestino grosso, tendo seu limite superior com o reto e inferior com a margem anal, mede em torno de 3 a 4 cm sendo revestido por um epitélio pluriestratificado do tipo escamoso, cuja área de transição para o epitélio colunar da mucosa do reto é denominada linha pectínea,

zona anal de transição ou junção escamocolunar anal, que tem semelhança com a do colo do útero (NADAL e MANZIONE, 2007; SANTOS, 2007).

Em estudo de meta-análise a prevalência de HPV no carcinoma anal foi maior em mulheres (90,8%) que em homens (74,9%). O HPV16 foi encontrado mais freqüentemente (75%) e o HPV18 com menor freqüência (10%) em carcinoma vulvar, vaginal e anal do que em carcinoma cervical; HPV6 e 11 foi um achado comum em neoplasia intra-epitelial vulvar grau 1 (NIV1) e neoplasia intra-epitelial anal grau 1 (NIA1), mas não em neoplasia intra-epitelial vaginal (NIVA) grau 1 (VUYST et al., 2009) e em 90% das verrugas anogenital (NADAL e MANZIONE, 2006).

Trabalhos reforçam esta relação, quando demonstram que neoplasia intra-epitelial cervical grau 3 (NIC3) em mulheres HIV negativas, teriam também a presença do HPV em canal anal em 35% dos casos (VÉO et al., 2008) e em pacientes portadoras de NIA 1, 2 ou 3, HIV negativas, com a presença do HPV anal em 44% dos casos (CAPOBIANGO et al., 2009).

Com o conhecimento dessas pesquisas, acredita-se que o vírus HPV promove a neoplasia intra-epitelial ano-genital assim como a prevalência do HPV seja igual nessas regiões e sendo assim vislumbrar a possibilidade de existir uma associação entre NIC3 ou NIVA2 provocadas pelo HPV, com as lesões do canal anal. Confirmada essa associação, definir condutas preventivas tais como: identificar os grupos de risco e incluir na rotina destes a anuscopia de magnificação, visando detectar e tratar a lesão intra-epitelial anal evitando assim a evolução para o câncer.

Os objetivos desta pesquisa consistem em: Estudar as lesões de NIC3 e NIVA2; avaliar as lesões provocadas pelo HPV no canal anal e comparar os achados de NIC3 ou NIVA2 com as lesões encontradas no canal anal, produzidas pelo HPV em mulheres HIV negativas.

Os métodos utilizados nesse estudo vão desde o momento do exame colposcópico, biópsia, histologia de NIC3 ou NIVA2 seguido do exame de anuscopia de magnificação com biópsia quando da presença de lesão anuscópica e seu diagnóstico histológico até a identificação do HPV através do PCR, utilizando a genotipagem para identificação viral nas mulheres cuja presença da lesão genital teve correspondência no canal anal.

A pesquisa foi realizada no Serviço de Pélvis do Hospital de Câncer de Pernambuco, tendo como orientador o Prof. Dr. Roberto José Vieira de Mello, originando dois artigos científicos. O artigo de revisão sistemática que tem como título: **HPV and pre-cancerous lesions of anal canal in women: Systematic review**, enviado para a revista *International Journal of Colorectal disease*, segundo as normas da revista (ANEXO A), aguardando aprovação, e o artigo original intitulado **Lesões HPV provocadas em mucosas anogenital em pacientes HIV negativas**, que será enviada para revista *Gynecologic Oncology*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ARTIGO DE REVISÃO

HPV and pre-cancerous lesions of anal canal in women: Systematic review

Maria das Graças F. C. Castor¹, Hilton Justino da Silva², Danyelly Bruneska Gondim Martins³, Roberto José Vieira de Mello⁴.

¹ Pelvis Department – Câncer Hospital of Pernambuco – Cruz Cabugá Avenue, 1597 - Santo Amaro - Recife - PE, P.O. Box 50040-000, Brazil.

² Phonoaudiology Department, Health Sciences Centre, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE – P.O. Box: 50670-901 – Brazil.

³ Molecular Prospection and Bioinformatics groups – Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Biochemistry Departament, Biological Sciences Centre, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE – P.O. Box: 50670-901 – Brazil.

⁴ Pathology Department, Health Sciences Centre, Federal University of Pernambuco - Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE – P.O. Box: 50670-901 – Brazil.

Corresponding author:

Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE – P.O. Box: 50670-901 – Brazil. *E-mail address:* bruneska@prospecmol.org

ABSTRACT

Objective: The infection caused by HPV in the anogenital area is considered the most common sexually transmitted infection in the world. Although anal cancer is relatively uncommon in the general population has shown a significant increase in incidence in recent years. In this review we direct the focus in research on anal lesions in women.

Method: Research on HPV and precancerous lesions of the anal canal were performed on a systematic literature review in the Cochrane Centre of Brazil, where 1,734 publications were identified in databases: Scielo Brazil, Pubmed, Lilac, Medline, Old Medline, the period 1966 to 2010 among which, the criterion of inclusion-exclusion, we selected two papers, published in 1994 and 2009, respectively.

Results: The first paper refers to the study of the anal canal in HIV negative women with previous genital pathology and its relationship to the presence of HPV, and the other compares two groups of women who are HIV (+) and HIV (-) and Its relationship with anal disease and HPV.

Conclusion: The existence of a previous genital neoplasia associated with HPV encourages the development of anal lesions, especially in younger patients and a poor immune status contributes to the appearance of this pathology.

Keywords: anal canal HPV, anal canal HPV women, anal HPV women HPV anal infection

INTRODUCTION

Anal cancer is relatively uncommon in the general population [1, 2], with an incidence around 1.5% of all tumours of the digestive system, and 2-4% considering only tumors in lower digestive tract [3, 4]. According to data provided by the American Cancer Society, 5,070 new cases were estimated for the year 2008: 3,050 women and 2,020 men. A total of 690 deaths would be attributed to anal cancer. Between 1975 and 1979, anal cancer was higher in females than males. However, between 1994 and 2000, the incidence was similar for the two sexes, and it continues to grow equally [5]. Human papillomavirus (HPV) has been pointed out as the most important cofactor for the development of premalignant and malignant anogenital lesions. This fact can be explained by the presence of similar epithelium in the anal canal and genital area [2, 6-10], which could favour the spread of the virus.

Véo et al [11] reinforce this idea, showing the presence of HPV in the anal section in 35% of HIV-negative women diagnosed with cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3).

The epidemiology of anal cancer is particularly distinct in some risk groups, such as those related to acquired immunodeficiency syndrome (HIV+), where the incidence increases from 25 to 50% [5]. Risk factors for anal cancer include smoking history, anal condyloma and anal intercourse [2, 5, 6, 12, 13].

After the epidemic of AIDS in 1982, there was increased incidence of cancer in men who have sex with men (MSM) due to human immunodeficiency virus (HIV) associated with HPV infection, promoting the development of premalignant anal lesions (anal intraepithelial neoplasia, AIN), including high-grade; AIN 2/3 [2] considered a precursor of cancer.

The result of the association of HPV and HIV in MSM is very clear [2, 13], but the incidence of premalignant HPV-induced in females has been given little attention, especially in relation to HIV-negative women. This review aims to evaluate the literature focused on HIV-negative women who show premalignant lesions in the anal section induced by HPV.

METHODOLOGY

We performed a systematic review of the literature on the subject through the Cochrane database Scielo Brazil, Pubmed, Lilac, Medline (1997/2010) and Old Medline (1966/1996) for the period of 1966 to 2010. We used the terms, descriptions and crossover of the two themes in Portuguese and English: “anal canal AND HPV”, “anal canal AND HPV and mulheres”, “HPV anal AND mulheres”, and HPV anal infection AND women.

The titles, abstracts and full text when necessary were carefully read. The inclusion criteria for selection of articles were defined as follows: descriptors or keywords present in the title written in Portuguese, English or Spanish; study female population between 20 and 60 years old; study is restricted to HIV-negative diagnosis; and the evaluation of premalignant lesions based on histological examination together with confirmation of the presence of HPV. Exclusion criteria were: systematic review articles or meta-analysis, case reports, and diagnoses made solely by cytological analyses and/or solely by the presence of HPV.

In total, 1734 articles were identified through the review strategy and were analyzed by two researchers in a judicious and independent way. Articles were selected when the inclusion criteria were fulfilled (Figure 1).

Patients under gynecologic assessment were invited to participate in a research about HPV lesions in the anal area. The patients who agreed, signed an authorization for image recording (Ethics Committee: 30/2009). Some photographs of HIV-negative women were included in this manuscript as an illustrative form of the lesions caused by HPV infection in the anal area.

RESULTS

The first article selected [14] was a study conducted in two hospitals in London during the period between January 1992 and July 1993. The first group (study) consisted of 40 HIV-negative women, aged 25-86 years, who were being treated for invasive vulvar cancer, no radiotherapy on pelvis or anogenital region, and underwent anal microendoscopy and biopsy. The second group (control) included 80 HIV-negative women, same age, with negative cervical cytology and no history of associated anogenital disease (Table 1).

All patients underwent magnified anoscopy with histological study of the abnormal epithelium. When no lesion was detected, anoscopy biopsy was performed for the anal transformation zone. The histological material was used for diagnosis of AIN and identification of HPV16 using PCR, as well as the histological vulva material.

In the control group, only 11 from 80 biopsies (13.8%) had a histological diagnosis of anal HPV16 infection by PCR despite no evidence of anal lesion. On the other hand, 19 women (47.5%) in the study group had histological diagnosis of anal HPV infection or squamous neoplasia. Among these, 18 (94.7%) women had the diagnosis confirmed in the initial anal examination and biopsy. While one women developed anal disease 18 months after initial examination. Twelve women (63%) had

HGAIN with associated histologic features of viral infection. One case also showed a microinvasive disease and another case progressed to invasive anal squamous cancer 18 months after the initial diagnosis. Five patients had histological evidence of invasive anal cancer (AIN3 was coexistent in four cases). Two women had a histological diagnosis of AIN1, with one of them showing evidence of viral infection.

Patients with anal disease were younger than those who did not present this disease. Thirteen of 19 patients (68%) with anal abnormalities showed a positive diagnosis together with the identification of a vulvar tumor. Three cases of AIN3 and two cases showing anal cancer were examined 3 and 10 years, after the diagnosis of vulvar lesion, respectively. Only five among 19 women (26%) had anal symptoms (warts, itch, and tumour) at the time of examination, two of these had AIN3, and three progressed to anal cancer. Seven women had primarily AIN3 or synchronous CIN3 (58.3%). In two cases, anal lesion extended from the AIN3 pectinate line to the perianal region, which is contiguous with the vulvar lesion (VIN3 and vulvar cancer).

In the study group, the authors were able to extract DNA from 33 biopsy, where HPV16 was detected in 16 anal samples (48.5%), with 14 being from patients with AIN3 and anal cancer while two other samples were from normal anal epithelium. HPV16 was also detected in 25 vulvar cancer samples (75%). The vulvar tumors of two women with anal pathology and nine women with normal epithelium showed the presence of HPV16 DNA.

The second article [12] refers to a prospective study conducted in different locations of United States: San Francisco Bay, Brooklyn and Chicago. This study was performed between 2001 and 2003 and included 470 HIV-positive women with anal epithelial lesions and 185 HIV-negative women. Women with an abnormal cervical or anal Pap smear were referred for colposcopy or magnified anoscopy with biopsy of

visible lesions. The authors also collected samples by exfoliation for PCR testing and HPV genotyping in order to estimate the risk of development of premalignant anal (Tabela1).

It was shown that 12% HIV-positive women had a low grade AIN (AIN1), while only 5% HIV-negative women had the same diagnosis. HGAIN diagnosis was observed in 9% HIV-positive women and 1% HIV-negative patients. The proportion of women reporting anal intercourse was high in both groups, that is, 47% for HIV-positive patients and 46% for HIV-negative patients, without significant differences. LGAIN was 3.8 times more common in patients with a history of receptive anal intercourse compared to women without such history. Anal HPV infection together with history of anal intercourse showed an increased risk of 12 to 17 times for low-grade AIN development compared with women who denied such activity.

HIV-positive women showed increased frequency of abnormal anal cytology/histology (31%) compared to HIV-negative women (9%), as well as abnormal cervical cytology/histology, which was 34% and 19%, respectively.

Among women who had anal cytologic and histologic evaluation, 20 women had atypical anal cytology and eight of these (40%) were upgraded to a more severe disease grade based on histological evaluation. Five (18%) among 28 women who had LGAIN anal cytology showed more severe lesions in histological comparison. In this assessment group, 63 women had an atypical Pap smear, and 46 women (73%) were upgraded to a more severe disease grade based on histological evaluation, while 25 women (39.7%) showed low-grade lesions (LSIL) in cervical cytology and eight of them (32%) were upgraded to a more severe grade disease based on histology.

HIV-negative patients who smoked were found to be more likely to have a higher grade of anal disease, where 52% of the women showed a normal

cytology/histology, 57% atypia, 63% low-grade AIN (LGAIN), and 64% high-grade AIN (HGAIN). A similar situation was observed in the analysis of women who were HIV-positive, where 51% of the women with a cytology/histology normal said they were smokers, while 58% had atypia, 65% LGAIN and 65% HGAIN.

DISCUSSION

The anal cancer is relatively uncommon compared to cervical cancer, a situation that has changed in the last 10 years, especially with regard to risk groups [5]. Studies show that HPV infection is the most common sexually transmitted disease in the world. Thus, it is not surprising to find the presence of this virus in the anal section even in the absence of anal intraepithelial neoplasia (pre-malignant lesion) [6, 11, 15, 16].

It was observed that HPV shows a tropism for skin and mucous membranes. Therefore, the epithelium of the anal section and its zone of transitional epithelium, composed by rectal columnar and anal squamous epithelium, similar to cervical cancer, is the region in which this virus shows a focus of activity [6, 9, 17]. Contamination due to the continuity of the anal canal with HPV-induced lesions in the vulvar and perianal areas should be considered, as well as the possibility of self-inoculation of HPV in the anal mucosa arising from cervical and vaginal mucosa [2, 18, 19].

Clinical investigations focused on HPV lesions in the genital area revealed a direct relation with the presence of condyloma in the anal area (Figure 2). These lesions also show the acetowhite epithelium as suggestive for HPV infection, which is also present nearby the transitional zone of the anal to rectal tissue (Figure 3).

Despite the importance of these considerations, only two papers focused on HPV infection in the anal canal of HIV-negative women during the period from 1966 to

2010. In the analysis of the existing work in this period through various databases, few works were found that dealt with precursor lesions of anal cancer in women, and this situation is more limited when the focus of the research is on HIV-negative women. United States and United Kingdom have the most active research cancer centres in the world. Thus, it is not a surprise to find papers from these countries, but the time gap between them 1994/2009 shows the little curiosity that the issue raised.

In one study [12] the number of HIV-negative women is 2.5 times less compared to HIV-positive women (185/470), reflecting the greater concern for studying the HIV-positive group. In this work, it was observed that in the group of HIV-positive women, the rates of high-grade (9%) and low-grade (12%) lesions were both higher than in HIV-negative women, i.e., 5% and 1% respectively. This fact shows a clear relationship between the importance of HPV and immune status, where there is low ability to avert infection by HPV in immunosuppressed patients, favouring the development of anal cancer precursor lesions. The situation becomes worse with a history of receptive anal intercourse associated with the presence of HPV, which increases the incidence of low grade AIN by 12 to 17 times, compared to women who deny such activity, regardless of immune status. No statistical difference was found for smokers and non-smokers groups of women with different immune states. It was also observed in this study that the frequency of HPV in the anal canal could vary according to the immune status of patients. However, the presence of HIV leads to an increased frequency of HPV in all cases.

In the analysis of the group [14] with HIV-negative women with prior vulvar cancer, it was observed that 94.7% of women showed the presence of anal HPV and squamous neoplasia at initial anal examination. The subsequent examinations conducted after 18 months, showed the presence of lesions that did not exist before or aggravation of the

type of lesion initially diagnosed, demonstrating the need of monitoring these patients for at least two years, with semiannual check ups, as in the routine management of patients with genital pathology.

Another important result of this study was the observation of higher incidence of anal disease in younger patients, probably due to immunological adaptation to the first viral infection. The research also shows that women with genital pathology (cervical, vulvar or perianal areas) are susceptible to develop anal disease, due to the presence of virus in the region. The anal symptoms (warts, itching, and tumor) in the study group (26%) at the time of first inspection, warrant the need for anal examination. However, the majority of these women (74%) were asymptomatic for anal disease, which highlights the importance of having knowledge about previous disease in the genital or perianal areas in the initial examination of the anal section, especially with diagnosis of malignant and premalignant lesions at different stages in the research.

HPV16 was found in anal, cervical, vulvar diseases, which reinforces the idea that the same viral type can circulate in these regions and occasionally promotes diseases. The presence of HPV16 in the anal canal of patients in the control group was around 13%. Therefore, some authors believe that the anal canal, as well as genital tract, could be part of the viral circuit, since it is close to the squamous epithelium, or even a reservoir of HPV [2] Therefore, women whose premalignant or malignant lesions in the genital or perianal area is already established, with the clear influence of HPV, should be included in a routine study of the anal canal by magnified anoscopy [9, 20] or anal cytology [11, 16, 21].

CONCLUSION

The importance of the gynaecology clinic in the prevention of genital HPV-induced lesions is already a fact supported by numerous studies [5], but routine gynaecological examinations only include preventive tests such as cytology, colposcopy and vulvoscopy. However, little attention has been paid to the anal area, as observed by the few publications, mainly with regard to HIV-negative women. Hence, an increase in research and publications on HPV as an important cofactor in anal cancer could prompt the gynaecologist to formulate practice guidelines, as well as management strategies for preventing anal disease in patients with a current or previous history of HPV in genital tract infection.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the patients for their inspiration and collaboration in the development of this review. Dr. A. Leyva provided English editing of the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Abbas A, Yang G, Fakin M (2010) Management of anal cancer in 2010. Part 1: Overview, screening, and diagnosis. *Oncology* 15:24(4):364-9.
2. Palefsky J (2010) HPV and anal cancer. HPV today (<http://www.hpvtoday.com>)

3. Ryan DP, Campton CC, Mayer RJ (2000) Carcinoma of the anal canal. *N Engl J Med.* 342(11):798-800.
4. Stearns MW Jr, Urmacher C, Sternberg SS, Woodruff J, Attiyeh F (1980) Cancer of the anal canal. *Curr Probl Cancer.*; 4:1-44.
5. Palefsky JM, Rubin M ((2009) The epidemiology of anal human papillomavirus and related neoplasia. *Obstet Gynecol Clin N Am.* 36(1):187-200.
6. Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, Schwart SM, Shera KA and Wurscher MA et al (2004) Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. *Cancer.* 101(2):270-80.
7. Handley JM, Maw RD, Lawther H, Horner T, Bharucha H, Dinsmore WW (1992) Human papillomavirus DNA detection in primary anogenital warts and cervical low-grade intraepithelial neoplasias in adults by in situ hybridization. *Sex Transm Dis.* 19(4)225-9.
8. Jiménez W, Paszat T, Kupets R, Wilton A, Tinmouth J (2009) Presumed previous human papillomavirus (HPV) related gynecological cancer in women diagnosed with anal cancer in the province of Ontario. *Gynecol Oncol.* 114(3):395-8.
9. Scholefield JH, Sonnex C, Talbot IC, Palmer JG, Whatrup C and Mindel A et al (1989) Anal and cervical intraepithelial neoplasia: possible parallel. *Lancet.* 2(8666):765-9.
10. Scholefield JH, Hickson WG, Smith JH, Rogers K, Sharp F (1992) Anal intraepithelial neoplasia: part of a multifocal disease process. *Lancet.*; 340(8830):1271-3.

11. Véo CA, Saad SS, Nicolau SM, Melani AG, Denadal MV (2008) Study on the prevalence of human papillomavirus in the anal canal of women with cervical neoplasia grade 3. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 140(1):103-7.
12. Hessol NA, Holly EA, Efird JT, Minkoff H, Schowalter K and Darragh TM et al (2009) Anal intraepithelial neoplasia in multisite study of HIV-infected and high-risk HIV-uninfected. *Aids.* 2:23(1):59-70.
13. McCloskey JC, Metcalf C, French MA, Flexman JP, Burke V, Beilin LJ (2007) The frequency of high-grade intraepithelial neoplasia in anal/perianal warts is higher than previously recognized. *Int J Std Aids.* 18(8):538-42.
14. Ogunbiyi OA, Scholefield JH, Robertson G, Smith JH, Sharp F, Rogers K (1994) Anal human papillomavirus infection and squamous neoplasia in patients with invasive vulvar cancer. *Obstet Gynecol.* 83(2):212-6.
15. Palefsky JM, Holly EA, Ralston ML, Da Costa M, Greenblatt RM (2001) Prevalence and risk factors for anal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus (HIV) positive and high-risk HIV negative women. *J Infect Dis.* 183(3):383-91.
16. Varnai AD, Bolimann M, Griefingholt H, Speich N, Schmitt C, Bolimann R (2006) HPV in anal squamous cell carcinoma and anal intraepithelial neoplasia (AIN). Impact of HPV analysis of anal lesions on diagnosis prognosis. *Int J Colorectal Dis.* 21(2):135-42.
17. Duggan MA, Boras VF, Inoue M, McGregor SE, Robertson DI (1989) Human papillomavirus DNA determination of anal condylomata, dysplasias, and squamous carcinomas with in situ hybridization. *Am J Clin Pathol.* 92(1):16-21.

18. Moscicki AB, Hills NK, Shiboski S, Darragh TM, Jay N and Powell K et al (1999) Risk factors for abnormal anal cytology in young heterosexual women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 8(2):173-8.
19. Giraldo P, Jacyntho C, Costa C, Igresias M, Gondim C and Carvalho F et al. (2009) Prevalence of anal squamous intraepithelial lesion in women presenting genital squamous intraepithelial lesion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod.* 142(1):73-5.
20. Scholefield JH, Ogunbiyi OA, Smith JH, Rogers K, Sharp F (1994) Anal colposcopy and the diagnosis of anal intraepithelial neoplasia in high-risk gynecologic patients. *Int J Gynecol Cancer.* 4(2):119-126.
21. Holly EA, Raiston ML, Darragh TM, Greenblatt RM, Jay N, Palefsky JM (2001) Prevalence and risk factors for anal squamous intraepithelial lesions in women. *J Natl Cancer Inst.* 93(11):843-9.

Table 1. Publications between 1966 and 2010 about HPV-induced lesions in the anal canal in HIV-negative women.

Local	Study type	Group (n)	Histologic lesion	HPV presence or Genotyping	Autor
United Kindon	prospective	Study (n=40)	01 HPV 02 AIN1 11 AIN3 04 AIN3+cancer 01 cancer	47.5% HPV anal 48.5% HPV16 anal 75% HPV16 vulvar 81% HPV anal/vulvar	14
		Control (n=80)	-	HPV16(13%)	
United States (USA)	prospective	HIVnegative (n=185)	AIN1 (3%) AIN3 (1%) Condyloma (2%)	50% HPV-negative 12% HR-HPV 33% LR-HPV 5% HR and LR-HPV	12
		HIV-positive (n=470)	AIN1 (7%) AIN2 (3%) AIN3 (6%) Condyloma (5%)	HPV-negative (20%) 14% HR-HPV 13% LR-HPV 30% HR and LR-HPV 20 N.A.	

N.A. = Not available

HR-HPV = high risk HPV

LR-HPV = low risk HPV

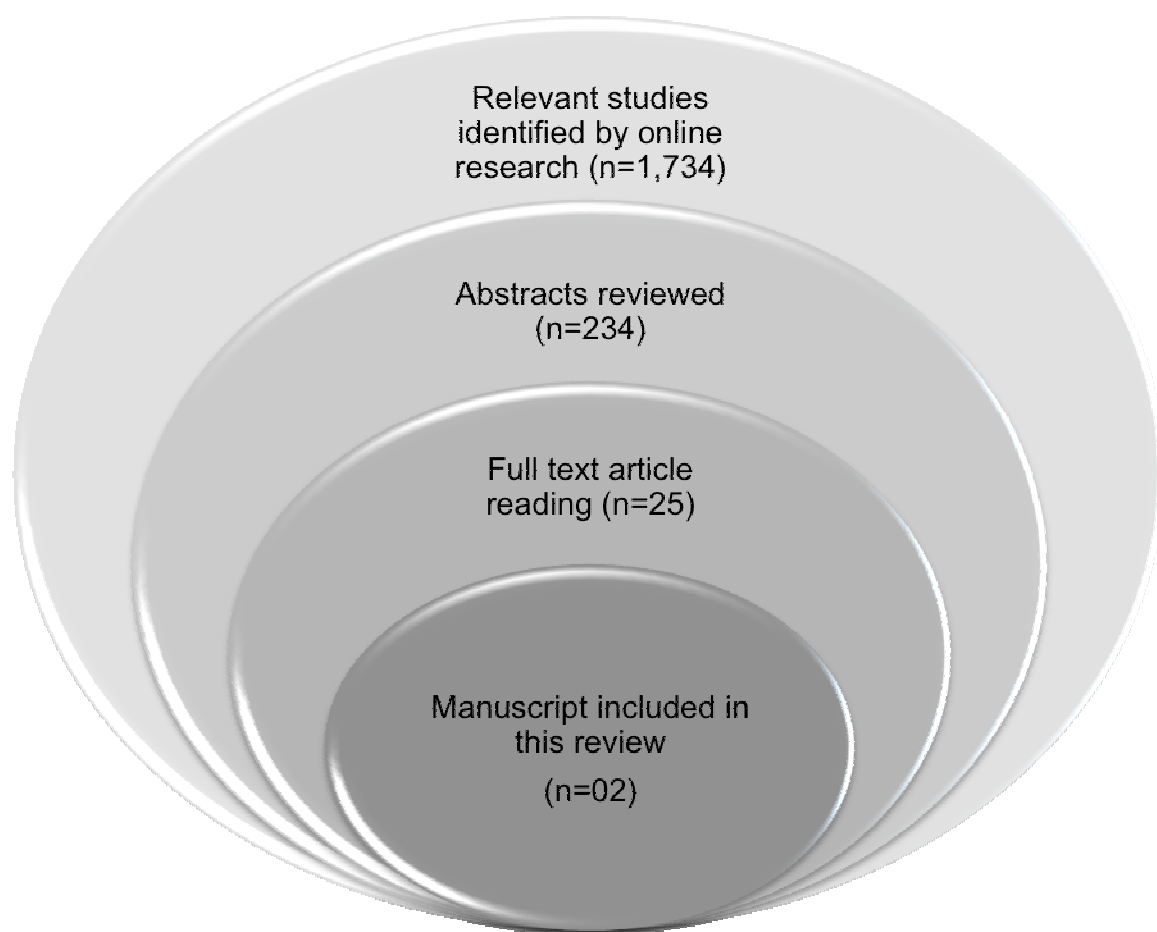


Figure 1. Scheme showing the study selection process for systematic review of anal lesions caused by human papillomavirus in HIV-negative women based on online database sources.

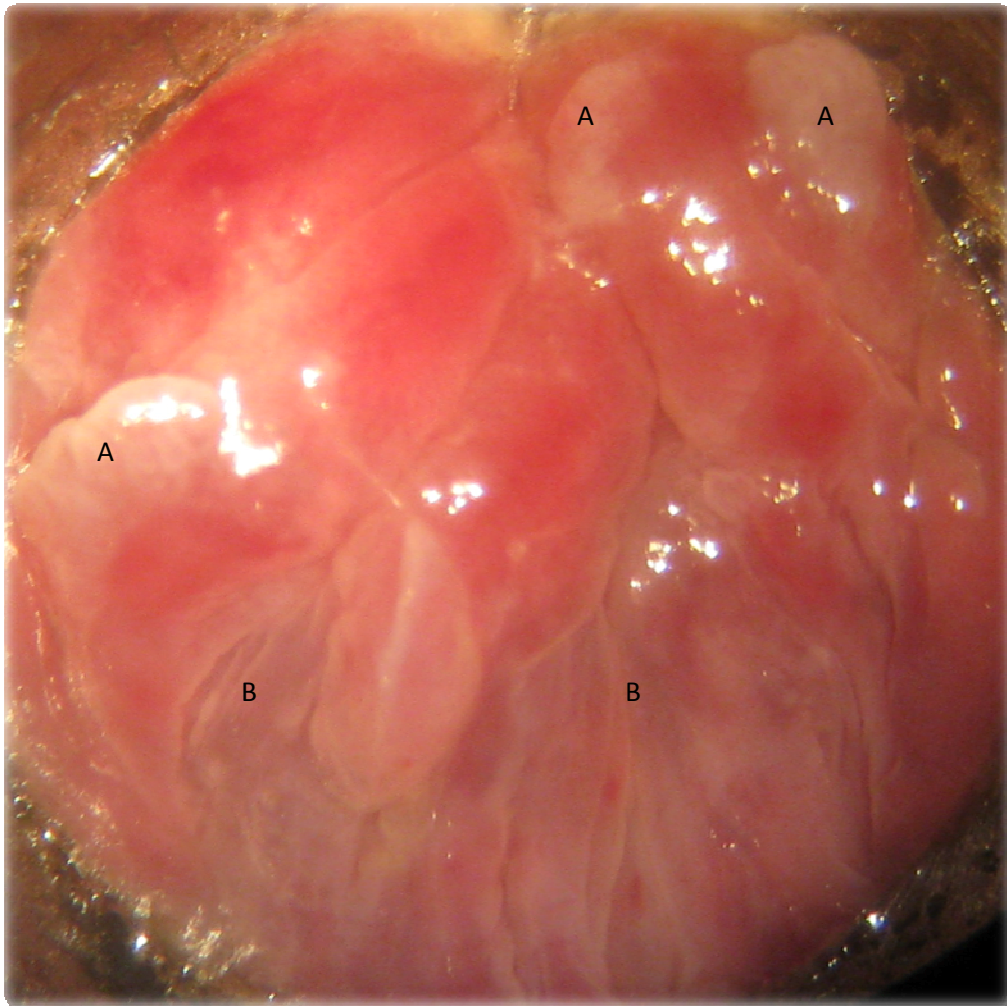


Figure 2. Photograph of magnified anoscopy in a patient in gynecological position, showing the transitional area of the anal epithelium with condyloma (A) and varicose veins (B).

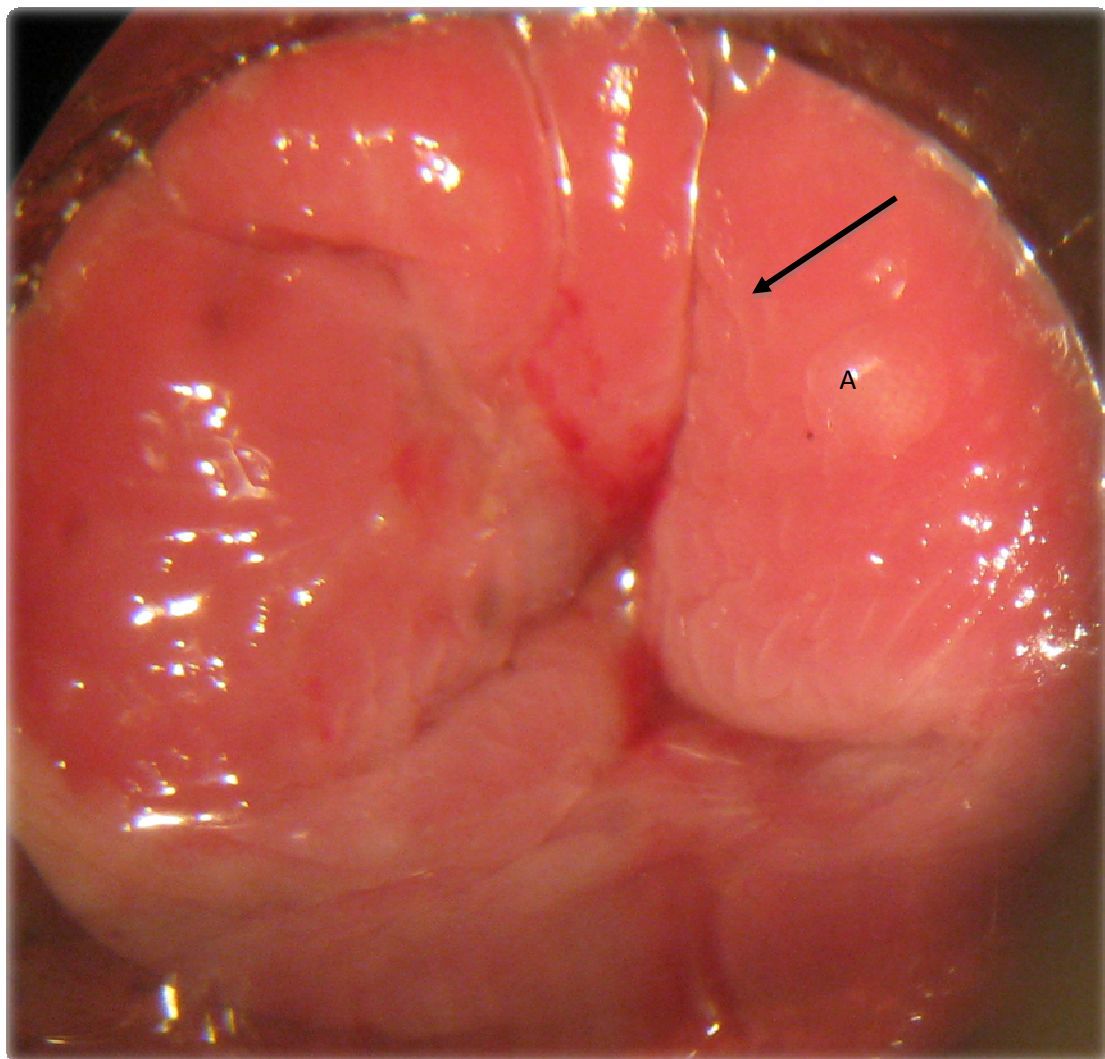


Figure 3. Photograph of magnified anoscopy in a patient under gynecological position, showing an HPV-induced lesion evidenced by acetowhite epithelium (A). The arrow indicates the transitional area of the anal epithelium.

METODOLOGIA

3 METODOLOGIA

3.1 Tipo de estudo

Estudo foi realizado, através do método observacional, analítico transversal, com pacientes atendidas no serviço de pélvis do Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), com neoplasia intra-epitelial genital (NIC3 e NIVA2), segundo os critérios de classificação de Richart, no período compreendido entre agosto e dezembro de 2009.

3.2 Local do estudo, população alvo e período de referência

3.2.1 Local do estudo - O estudo foi realizado no Serviço de Pélvis do HCP, situado à Avenida Cruz Cabugá no bairro de Santo Amaro, na cidade de Recife, Pernambuco. É um centro de referência em câncer do estado e oferece aos indivíduos com patologias ligadas ao câncer, vários serviços, entre eles, o serviço de pélvis direcionado exclusivamente à mulher. O serviço tem uma demanda aproximada de 10 indivíduos novos por dia, oferecendo desde atenção primária, através de métodos de rastreamento como coleta para citologia oncótica (Papanicolaou), atenção secundária como colposcopia, vulvoscopia, anoscopia de magnificação, biopsia dirigida por visão colposcópica, em região perianal, canal anal, vulva, colo do útero e vagina, até o tratamento pós-diagnóstico que poderá ser clínico, cirúrgico, radioterápico ou quimioterápico, dependendo do diagnóstico firmado. No ambulatório de exames especiais (vulvoscopia, colposcopia perianal e de canal anal), na presença de lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas associadas a patologias sabidamente de transmissão sexual, é oferecido às pacientes o teste rápido para HIV, que em caso de concordância, é realizado no laboratório de análise clínica do HCP. As análises do material histológico e de citologia oncótica são processadas no Departamento de Patologia do HCP.

3.2.2 População alvo e período de referência - O estudo teve a participação de mulheres encaminhadas com alterações citológicas, colposcópica e/ou histológicas, no período de agosto de 2009 a dezembro de 2009, sem distinção de raça e cor, com faixa etária entre 18 a 60 anos, com participação voluntária. A idade mínima foi escolhida por questões operacionais, evitando a inclusão de pacientes menores de idade, enquanto o limite máximo da faixa etária se justifica pela prevalência de um segundo pico de HPV, descrita na literatura, na faixa etária entre 40 e 50 anos (ROSENBLANTT et al., 2005; NADAL e MANZIONE, 2006; ZAMPIROLO et al., 2007).

3.3 Critérios de inclusão e exclusão para seleção da amostra

3.3.1 Critérios de inclusão:

- Pacientes com idades entre 18 e 60 anos;
- Pacientes que tiveram diagnóstico histológico para NIC3 ou NIVA2, em material de biópsia ou conização por alça diatérmica, realizadas no serviço;
- Pacientes que aceitaram realizar o teste de HIV e apresentaram resultados negativos;
- Pacientes que aceitaram realizar a anoscopia de magnificação.

3.3.2 Critérios de exclusão:

- Pacientes que não apresentaram disponibilidade para realização dos estudos;
- Pacientes que tiveram diagnóstico histológico de lesão intra-epitelial de baixo grau e carcinoma invasor em colo de útero/vagina ou lesão intra-epitelial vaginal grau 3 e cervical grau 2;
- Pacientes portadoras do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV);
- Pacientes que recusaram realizar o teste para HIV ou realizar o exame de anoscopia;
- Mulheres imunodeprimidas por outros fatores, não relacionados ao HIV (doenças auto-imunes; transplantados);
- Mulheres menores de 18 anos e maiores de 60 anos.

3.4 Método de coleta de dados

3.4.1 Coletas de dados

Para coleta dos dados, foi utilizada ficha padronizada (Apêndice A), onde foram anotadas informações obtidas durante a entrevista com os pacientes. Os procedimentos relatados na pesquisa já fazem parte da rotina do ambulatório do serviço de Pélvis do

HCP. Nos dados solicitados foi valorizado a idade, número de parceiros, intercurso anal, uso de preservativo vaginal e anal, história de condiloma vulvar ou perianal.

3.4.2 Procedimento na seleção da amostra

Pacientes que apresentaram citologia oncológica e/ou colposcopia alterada, foram encaminhadas pelo serviço de coleta de citologia oncológica, existente no hospital ou por outros centros de saúde, para o ambulatório do serviço de Pélvis, transitando antes por um serviço de triagem do hospital. As que não apresentaram o resultado do exame histológico realizado em outro serviço foram agendadas para realização do exame colposcópico. Na realização do exame, a paciente foi colocada na posição ginecológica (Posição de litotomia) introduzindo-se o espéculo no canal vaginal, onde foi visualizado o colo de útero e paredes vaginais a procura de lesões condilomatosas ou leucoplásicas. Posteriormente foi aplicado o ácido acético a 3%, com a finalidade de evidenciar lesões suspeitas, baseada na classificação colposcópica da Federação Internacional de Patologia Cervical e Colposcopia (IFCPC) e o teste de Schiller (iodo a 5%), que delimita a lesão. A lesão foi biopsiada, utilizando-se a pinça de Medina. Quando a lesão se encontrava na porção distal vaginal, próximo a vulva (presença de sensibilidade dolorosa), foi feita sob anestesia local, sendo então colocado um tampão com intuito de estancar o sangue.

Com a positividade do exame histológico das lesões do colo do útero ou vagina (NIC3 ou NIVA2), foi indicada a realização da anuscopia de magnificação, método adaptado do artigo “Uso do colposcópio para avaliar a região perianal e o canal anal” (NADAL e MANZIONE, 2004). O procedimento foi realizado com a paciente em posição ginecológica, sendo em seguida introduzido o anuscópio, envolvido em vaselina aquosa e depois da retirada do êmbolo para visualização e exame da porção terminal da ampola retal com seu epitélio colunar e da área de transição para o epitélio escamoso do canal anal denominada linha pectínea ou junção escamocolunar anal. Após avaliação do epitélio escamoso anal sem preparação, a procura de queratose (leucoplasia) ou lesões condilomatosas. Foi aplicado o ácido acético a 5% e com o auxílio do colposcópio, foi observada a presença de lesões suspeitas conforme a classificação colposcópica da IFCPC.

Para descrição das lesões foi levado em consideração o sentido horário de sua localização dentro do canal anal, sendo então o local biopsiado sob anestesia local, com

lidocaína a 2% sem vasoconstrictor. Após a biopsia foi utilizado com o auxílio de um cotonete de haste longa, a solução homeostática de policresuleno concentrada (360mg/g) com a finalidade de estancar o sangue.

Os fragmentos retirados pela biopsia cervical, vaginal ou anal foram colocados em solução de formol a 10% e encaminhados ao Departamento de Patologia do HCP onde foram colocados em blocos de parafina e submetidos à rotina histológica com a micrótomia para obtenção dos cortes e preparação das lâminas, coradas pela hematoxilina-eosina (HE). Os cortes histológicos foram analisados por patologistas para definição do diagnóstico, sendo o laudo baseado na classificação de Richart (1967), NIC para colo de útero e adaptação da classificação, para vagina NIVA (PEREYRA e PARELLADA, 2005) e canal anal NIA (NADAL e MANZIONE e CALORE, 2007).

A totalidade das pacientes que fizeram parte do trabalho foram submetidas ao teste rápido para HIV, imunocromatográfico, detectando qualitativamente anticorpos contra o HIV 1 e 2 no soro, com resultados negativos. Este método, em trabalhos pesquisados, mostra resultados falso-negativos em 1,7% e 5% no sangue ou soro respectivamente, em pessoas sem dúvida infectadas pelo HIV e nenhum resultado falso-positivo (NETO et al., 2000), Sendo sua sensibilidade de 100% e a especificidade de 99,5% (DUARTE et al., 2001).

3.5 Definição das variáveis

As variáveis do estudo estão definidas em:

3.5.1 Características demográficas

Idade - número de anos decorridos desde o nascimento do paciente até o momento da pesquisa:

- 18-25
- 26-35
- 36-45
- 46-60

3.5.2 *Característica da vida sexual:*

Parceiros sexuais durante a vida - variável referente ao número de parceiros do sexo oposto nas relações sexuais vaginais, desde o início da atividade sexual:

- Um
- Dois
- Três
- Quatro
- Cinco ou mais

Uso de preservativo na relação vaginal - definido como o hábito de usar preservativo masculino, durante a relação sexual vaginal:

- Sim
- Não

Uso de preservativo na relação anal- definido como hábito de usar preservativo masculino, durante a relação sexual anal:

- Sim
- Não

Relação sexual anal- definida como prática dessa atividade sexual:

- Sim
- Não

História de condilomas vulvar ou perianal- variável relacionada com a informação sobre ocorrência de lesões vegetantes condilomatosas em região vulvar ou perianal.

- Sim
- Não

3.5.3 Características do exame de canal anal:

3.5.3.1 *Lesão anal sugestiva no exame de anuscopia de magnificação* - Relacionada à avaliação das lesões anais pelo exame de anuscopia de magnificação, baseado na adaptação da classificação colposcópica (IFCPC), respeitando as características locais (NADAL, MAZIONE e CALORE, 2007; FOCCHI, 2008);

- Ausente - Aspecto da mucosa anal normal, que não apresentava, após aplicação do ácido acético, alterações do epitélio;
- Presente - Quando o epitélio apresentava alterações focais sob visão colposcópica descritas a seguir:
 - Queratose (leucoplasia) - Lesão visível, antes da aplicação do ácido acético, que não a modifica, constituída de uma camada de ceratina, que diante do córion forma um filtro opaco, branco, granulado e brilhante, frequentemente em alto-relevo;
 - Epitélio acetobranco - descrito como epitélio que após a aplicação da solução de ácido acético, apresenta uma zona branca plana e fosca, que esconde o tecido conjuntivo, ocasionado pela coagulação temporária de suas proteínas (CARTIER e CARTIER, 1994), podendo ser plano ou denso;
 - Mosaico - definido como uma alteração focal, no qual a formação vascular é entremeada de área branca em decorrência a coagulação das proteínas do epitélio, adquirindo padrão retangular como mosaico, podendo ser fino ou grosseiro;
 - Pontilhado - quando o epitélio se apresenta opaco e no vértice de cada eixo conjuntivo-vascular ele é delgado, transparecendo como forma de pontilhado, podendo ser fino ou grosseiro;
 - Vasos atípicos - área colposcópica anormal, no qual o padrão vascular se apresenta como vasos irregulares com curso interrompido abruptamente e com aparência de vírgulas, vasos capilares espiralados, grampos ou com formas variadas;

- Condiloma acuminado se mostra como um grupamento de papilas que sofrem hiperplasia, tendo base única, nas quais o epitélio escamoso recobre alças vasculares;
- Erosão - Alteração colposcópica que traduz perda do epitélio, podendo ser causado por trauma ou fragilidade de um epitélio anormal.

3.5.3.2 *Lesão de canal anal, evidenciado pela biopsia* - baseada na classificação histológica adaptada de Richart (GOMPEL e KOSS, 1997; VARGAS, 2008), considerando as características anatômicas da região anal (NADAL, MANZIONE e CALORE, 2007), caracterizado como:

- Ausente - Quando o exame histológico mostrava um epitélio normal, com ausência de lesão intra-epitelial anal.
- Presente - Quando anormalidades histológicas estavam presentes em graus ou características (MIRANDA et al., 2006), descritas abaixo:
 - NIA1(neoplasia intra-epitelial anal) - Quando a proliferação de células basais atípicas e com modificação de polaridade, atinge principalmente a camada basal do epitélio, quando associada ao HPV, apresenta vacuolização perinuclear (coilocitose) e atipias nucleares;
 - NIA2 - Quando a célula indiferenciada atinge as camadas basal e intermediária do epitélio, as atipias são mais pronunciadas e as mitoses mais freqüentes, pode está associado ao HPV;
 - NIA3 - Quando as alterações de polaridade e diferenciação são ainda mais intensas, atingindo praticamente toda a espessura do epitélio, apresentando algum grau de diferenciação na camada superficial. Figuras de mitoses típicas e atípicas são mais comuns; e quando associado ao HPV, apresenta coilocitose, além das atipias nucleares, mostram também vacúolos citoplasmáticos;
 - Carcinoma *in situ* (CIC) - Quando as alterações de polaridade e diferenciação são intensas atingindo todas as camadas do epitélio, não se encontra grau de diferenciação em nenhuma camada do epitélio, o HPV pode está presente;

- Carcinoma microinvasor - Quando a atipia celular, atinge todas as camadas do epitélio, apresentando focos de invasão superficial do tecido adjacente, ultrapassam a membrana basal, invadindo o estroma até 3 mm de profundidade e 7 mm de largura - adaptação do estadiamento do câncer do colo de útero, de acordo com a Federação Internacional de ginecologia e obstetrícia – FIGO, 1994 (MIRANDA et al.,2006);
- Condiloma acuminado - Quando ao exame histológico apresenta uma proliferação arborescente do epitélio escamoso estratificado, apoiado sobre um estroma fibroso, observa-se principalmente atipia celular nas células da superfície acompanhada de vacuolização perinuclear (coilocitose).

3.5.4 – Características do exame cervical

3.5.4.1 - *Lesão cervical evidenciado pela biopsia*, baseada na classificação de Richart, caracterizado como:

- NIC3 (neoplasia intra-epitelial cervical) - Quando praticamente toda espessura do epitélio tem células atípicas, apresentando alguma diferenciação na camada superficial.

3.5.5 Característica do exame vaginal

3.5.5.1 *Lesão vaginal evidenciada pela biopsia* - baseado na adaptação da classificação histológica de Richart respeitando as diferenças anatômicas da área vaginal (PEREYRA e PARELLADA, 2005) caracterizado como:

- NIVA2 (neoplasia intra-epitelial vaginal) - Quando a atipia celular atinge a camada basal e intermediária.

3.5.6 Papillomavirus humano (HPV)

A identificação do Papillomavirus humano, em exames com positividade histológica do material do colo do útero, vagina e canal anal foi o passo seguinte. Dos blocos de parafina, foram obtidos 3 a 5 cortes de 0,2 µm, sendo desparafinado com xilol. Lavados com 100% de etanol, usado para remover traços do xilol do tecido (KHAN et al, 2007). Após os traços de o etanol ser removidos por secagem ao ar, o tecido foi homogeneizado e em seguida adicionado 243,7 µl de (0,01M Tris-HCL,

pH7,4) + 0,25% duodecil sulfato dissódico mais 6,3 µl Proteinase K (20mg/ml) incubado à 55 °C, ferver por 2-3 min, centrifugado a alta velocidade por 2 min e separado cuidadosamente a solução aquosa de aglomerados e parafina, em seguida foi usado a reação em cadeia da polimerase (PCR), para identificação de uma região do gene L1 do HPV.

O DNA extraído foi amplificado em dois sistemas de reação utilizando-se dois pares de oligonucleotídeo consensuais MY09/11 (fragmento de 450 pb) (MY09 – 5'-CGTCCAAAAGGAAATGAGC – 3'; MY11 – 5'- GCACAGGGCATAACAATGG – 3') (Manos et al, 1989) e GP5+/6+ (fragmento de 150 pb) (GP5+ 5'- TTTGTTACT GTGGTAGATACTAC - 3'; GP6+ 5'- GAAAAATAAACTGTAAATCATATT – 3') (Karlsen et AL., 1996). As condições da PCR foram estão descritas na Tabela 2. A programação de amplificação foi realizada pela: desnaturação inicial por 3min a 94°C, seguido de 34 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min, anelamento a 55°C (MY09/11) ou 45°C (GP5+/6+) por 1 min e extensão a 72°C por 1 min. A etapa de extensão final foi realizada a 72°C por 10 min. Para ambas as reações utilizou-se água ultrapura como controle negativo da reação, sendo o controle positivo uma mistura de 1µL de sangue humano acrescido de 0,25 µL do plasmídeo pBR322 contendo o genoma do HPV16. Para pesquisa do genoma do HPV16 nas amostras positivas para MY09/11 e GP5+/6+ foram realizadas amplificações com oligonucleotídeos específicos para o gene E7 (FwE7.16 5'-TTGCAGATCATCAAGAACACG-3; RvE7.16 5'-GTACCCTCTTCCCCATTGGT -3), seguindo a mesma composição descrita na Tabela 2. O programa de amplificação foi realizado nas seguintes condições: 95°C por 2 min; 30 ciclos de 95°C por 30 seg; 54°C por 30 seg e 72°C seg; e 72°C por 5 min. A reação foi realizada em termociclador Eppendorf ® Mastercycler utilizando-se os reagentes descritos na Tabela 02. O sucesso da amplificação foi verificado por eletroforese em gel de agarose 2% (p/v), corado em 2 µl de brometo de etídio (10 mg/ml) e visualizado sob luz ultravioleta.

Tabela 02 - Volumes dos componentes da PCR para região L1-HPV.

Componentes	Volume
GoTaq Green Master Mix	6,25 µL
Oligonucleotídeos (10 picomoles)	1 µL
DNA (~200 ng/µL)	1 µL
Água Ultrapura	4,25 µL

3.5.6.1 *Papillomavirus humano (HPV) em amostra cervical* - encontrado em material de biopsia ou da conização com alça diatérmica (cirurgia de alta frequência - CAF):

- Ausente- Quando o HPV não foi detectado na amostra;
- Presente- Quando o HPV foi detectado na amostra:

3.5.6.2 *Papillomavirus humano (HPV) em amostra vaginal* - evidenciado na amostra de biopsia de vagina:

- Ausente – Quando o HPV não foi detectado na amostra;
- Presente – Quando o HPV foi detectado na amostra;

3.5.6.3 - *Papillomavirus humano (HPV) em amostra de canal Anal* - detectado em material de biópsia:

- Ausente – Quando não havia HPV na amostra;
- Presente – Quando havia HPV na amostra;

4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os métodos utilizados para realização dos exames colposcópico do colo do útero, vagina e canal anal, exige do profissional médico, a necessidade de um bom contato inicial com o paciente, já que a região do corpo da mulher, objeto deste estudo, traz em torno de si questão tabu, gerando vergonha e constrangimento ao se expor para o procedimento principalmente quando se refere ao exame do canal anal, prática até hoje, pouco indicada, quando da ausência de queixas e mesmo na presença desta ocorre relutância na procura de um profissional da área. Decorre daí a necessidade de ter uma estratégia de abordagem dessas mulheres, onde a sensibilidade do pesquisador quanto ao momento de fragilidade que essa mulher está atravessando deverá estar presente.

O fato de o estudo ter sido realizado num ambulatório de uma unidade hospitalar (HCP) direcionado ao diagnóstico e tratamento de lesões pré-malignas e malignas, gerou nessas mulheres muita ansiedade e ao serem encaminhadas ao serviço de pélvis do hospital, elas tiveram consciência de que “algo” no exame deu errado.

Os exames colposcópico do colo do útero e vagina, apesar de provocar um discreto incômodo ou leve dor na etapa de introdução do espéculo, não geraram recusa na grande maioria das vezes, provavelmente porque essas mulheres já têm conhecimento prévio do exame ou mesmo experiências anteriores.

Antes do procedimento uma conversa amigável e franca com o examinador proporcionou maior tranquilidade a paciente. Quando se trata do exame do canal anal, a resistência inicial é maior baseada no próprio desconhecimento da mulher sobre a necessidade mesmo sem queixas, da realização desse exame; nesse ponto, deixamos bem claro a possibilidade de acatarmos a decisão de não realizar-lo, caso a paciente assim decidisse, mas que sua patologia cervical ou vaginal favoreceria o surgimento de possíveis lesões do canal anal (pela presença do HPV), descrevendo nesse momento, os riscos que a mesma corre baseados em pesquisas (VÉO et al., 2008; CAPOBIANGO et al., 2009). Foi também nessa ocasião explicitado a necessidade de a paciente realizar o teste rápido para HIV.

Após a aceitação da realização dos exames, foi ofertada a paciente a possibilidade de participar do projeto de estudo e que as informações fornecidas estariam submetidas às normas éticas recomendadas pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e quando da concordância foi solicitado da paciente a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE (Apêndice B), conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Em alguns casos, foi solicitada também a permissão para realizar fotografias do procedimento e com a concordância da paciente foi assinado um termo de autorização de uso de imagem (Apêndice C), ficando claro que a recusa por parte da paciente em participar do projeto de estudo, não afetaria em momento algum a realização de outros exames necessários ao seu tratamento assim como a realização de procedimentos clínicos ou cirúrgicos que sua patologia necessitasse.

Aprovação do comitê de ética do Hospital de Câncer de Pernambuco ocorreu sob o número 30/2009 (anexo D).

O incômodo existente tanto na realização dos exames de colo de útero, vagina e canal anal, quanto na aplicação do anestésico (picada da agulha) no caso de canal anal e terço externo vaginal, foi minimizado com uma abordagem tranqüila, com explicações sobre o procedimento e o motivo de sua realização usando uma técnica menos traumática, como na manutenção da posição ginecológica em ambos exames, que foi de

maior agrado das pacientes fazendo com que as mulheres submetessem a esses procedimentos considerando-os toleráveis, quando da comparação dos seus benefícios em relação aos riscos.

Pacientes encaminhadas com exames citológicos (Papanicolau) alterados têm a possibilidade, ao realizar a colposcopia, de detectar lesões pré-malignas produzidas pelo HPV surpreendendo as lesões em uma fase anterior ao câncer invasor e com isso serem beneficiadas com um tratamento curativo, como na NIVA2 com o tratamento clínico (ácido tricloroacético - ATA) ou por polifragmentação da lesão (biopsia alargada). No caso de NIC3 tratamento obtido através da conização por alça diatérmica, que é um procedimento cirúrgico rápido e eficiente realizado em ambulatório, onde o tratamento dessas lesões evita um diagnóstico mais tardio do câncer ginecológico que acarretaria tratamentos mais agressivos, como cirurgias de grande porte, radioterapia ou quimioterapia, além do risco de redução da sobrevida da paciente.

O mesmo ocorre quando o exame anuscópico sob colposcopia é indicado e revela presença de patologia pré-maligna, onde o tratamento clínico é indicado nas lesões anais de baixo grau (HPV e NIA1), e pequena cirurgia em lesões de alto grau (NIA2, 3 e *carcinoma in situ*), evitando a progressão para câncer anal invasor, quando suscitaria um tratamento mais agressivo.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Artigo original

ARTIGO ORIGINAL

Lesões provocadas pelo HPV em mucosas anogenital em pacientes HIV negativas

Maria das Graças F. C. Castor¹, Marina Cartaxo², Danyelly Bruneska Gondim Martins², Roberto José Vieira de Mello³.

¹ Departamento de Pélvis –Hospital de Câncer de Pernambuco – Avenida Cruz Cabugá, 1597 - Santo Amaro - Recife - PE, CEP 50040-000, Brasil.

² Grupo de Prospecção Molecular e Bioinformática – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE – CEP: 50670-901 – Brasil.

³ Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE – CEP: 50670-901 –Brasil.

Autor correspondente:

Rua Zeferino Galvão, n. 100, Apt 1304, Boa Viagem, Recife - PE, Brasil. CEP: 51111-110. *E-mail address:* castor@smartsat.com.br (M.G.F.C. Castor).

RESUMO

Objetivos: O papillomavírus humano atualmente é considerando o maior causador de infecções multifocais de transmissão sexual do mundo, comprometendo o sistema anogenital principalmente feminino. O câncer anal apesar de ser considerado relativamente raro, vem apresentando um aumento progressivo de sua incidência nos últimos anos. Neste estudo foi realizada uma correlação entre as lesões genital de neoplasia intra-epitelial de colo de útero grau 3 (NIC3) e a neoplasia intra-epitelial vaginal grau 2 (VAIN2) provocadas pelo HPV e as lesões anal correspondentes em pacientes HIV negativas.

Metodologia: No período de Agosto a Dezembro de 2009, mulheres HIV negativo foram entrevistadas e submetidas a exame de colposcopia onde, na presença de lesão colposcópica foram submetidas à biópsia. Após a confirmação dos resultados de NIC3 ou NIVA2, as pacientes foram submetidas à anuscopia de magnificação, onde na presença de lesão de canal anal foi realizada a biópsia. Os materiais histológicos de colo, vagina e canal anal foram submetidos ao teste de PCR para identificar a presença do HPV.

Resultados: Dentre as 122 mulheres com patologia genital, 114 (93,4%) tiveram diagnóstico histológico de NIC3 e 08 de NIVA2 (6,6%). Em 68 mulheres (55,7%) com NIC3, houve lesões de canal anal, enquanto que dentre as 08 mulheres com diagnóstico de NIVA2, seis (75,0%) apresentaram lesão anal. Os testes de biologia molecular foram positivos para DNA-HPV em 66 amostras cervicais (54,0%) e em 31 amostras anal (41,9%) para pacientes diagnosticadas clinicamente como NIC3. DNA-HPV também foi encontrado em 06 amostras vaginais (75%) e em 04 amostras de canal anal (50,0%) em pacientes com diagnóstico de NIVA2.

Conclusão: A presença concomitante de neoplasia intra-epitelial genital NIC3 e NIVA2 com lesões anais associado à presença do HPV indica relação entre estas patologias e a possível circulação viral nestes locais.

Introdução

O papillomavirus humano (HPV) e sua relação com o câncer cervical já está bem estabelecida e a redução na incidência do câncer cervical já é conseguida em alguns países em desenvolvimento, onde o controle das neoplasias intra-epitelial está se tornando mais eficiente. No entanto, o câncer anal que apesar de ser considerado um câncer incomum, vem apresentado nesses últimos anos um crescimento progressivo de sua incidência, principalmente nas mulheres ^{14, 16}.

O câncer anal tem similaridades com o câncer cervical, inclusive com relação ao genótipo de HPV encontrado no canal anal com mais frequência de que na área cervical. Estes dados sugerem que esta região seja reservatório do vírus, favorecendo sua transmissão a outros locais do sistema genital. As neoplasias intra-epiteliais de alto grau são consideradas precursoras do câncer anal ¹⁴.

Alguns trabalhos realizados em mulheres HIV negativas mostram a presença de 5% da neoplasia intra-epitelial anal de baixo grau (HPV, NIA1) enquanto que a neoplasia intra-epitelial anal de alto grau (NIA2, NIA3) foi encontrada em 1% ⁶. Em mulheres onde existia uma lesão genital prévia as lesões de neoplasia anal (ASIL) atingiu 17,4% onde 3,2% eram lesões de alto grau ⁵.

Apesar dos poucos estudos, sobre o comportamento das NIAs, alguns autores apontam alta taxa de regressão das formas iniciais de NIA ¹³, com menos de 5% de progressão para câncer invasor¹. Nas mulheres HIV negativas com HPV a taxa de progressão para NIA é de 1 a 2,8% ^{1,7}.

Adicionalmente, a mucosa vaginal pela proximidade com a região cervical se torna alvo fácil para o HPV, podendo levar ao desenvolvimento da neoplasia intra-epitelial vaginal (NIVA) e o câncer vaginal. O câncer vaginal é raro apresentando a menor frequência dentre os cânceres femininos. A taxa de padronização por idade é de 0,3-0,7 por 100.000 em todo mundo, constituindo em torno de 1% a 2,5% das neoplasias malignas do trato genital feminino. Estudos epidemiológicos indicam que o câncer vaginal tem semelhança com o câncer do colo do útero e as seqüências do DNA do HPV são detectados na maioria dos tumores vaginais e seus precursores. HPV16 é o genótipo mais prevalente e sua frequência varia de 64 a 91% do câncer vaginal ^{17,18,20}.

Metodologia

Amostragem

Foi realizado um estudo prospectivo com 122 pacientes, sendo 114 portadoras de neoplasia intra-epitelial cervical (NIC3) e 08 portadoras de neoplasia intra-epitelial vaginal (NIVA2), com idade entre 18 e 60 anos, atendida no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) no período de agosto a dezembro de 2009. O projeto da pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Câncer de Pernambuco (CEP/HCP) através do protocolo de número 30/2009. Foi realizada uma análise sobre a prática sexual de cada paciente com os seguintes parâmetros: parceiros sexuais durante a vida (um, dois, três, quatro, cinco ou mais); uso de preservativo na relação vaginal, anal e história de condilomas vulvar ou perianal.

Mulheres portadoras de neoplasia intra-epitelial de baixo grau, carcinoma invasor em colo de útero ou vagina, neoplasia intra-epitelial vaginal grau 3 e pacientes com quadro de imunodeficiência, foram excluídas do estudo. As mulheres que aprestavam citologia oncológica e/ou colposcópica com atipias, foram submetidas à biópsia sob colposcopia para confirmação diagnóstica. Após diagnóstico de NIC3 ou NIVA2, foram submetidas ao exame de anuscopia de magnificação para detectar lesões anais.

Anuscopia de magnificação

Na realização do exame anuscópico foi realizada por inspeção do canal anal, seguida por aplicação de ácido acético 5% para visualização de possíveis lesões. No exame de anuscopia de magnificação, foi seguido os critérios da classificação colposcópica (IFCPC) adaptada para canal anal^{3,12}. Pacientes com alterações anuscópicas foram submetidas à biópsia, realizada sob anestesia local, utilizando posteriormente um cotonete de haste longa embebido com policresuleno (360mg/g) com a finalidade de estancar o sangue.

Análise histológica

Os fragmentos retirados pela biópsia cervical, vaginal ou anal foram colocados em solução de formol a 10%, colocados em blocos de parafina e submetidos à rotina histológica com a micrótomia para obtenção dos cortes e preparação das lâminas, coradas pela hematoxilina-eosina (HE). O diagnóstico histológico foi realizado

utilizando a classificação de Richart (1967), NIC para colo de útero e adaptação da classificação, para vagina NIVA¹⁷ e canal anal NIA¹². Para uma melhor compreensão foi referida em alguns momentos sua equivalência na terminologia de Bethesda⁸.

Identificação do Papillomavirus humano (HPV)

A identificação do Papillomavirus humano, em exames com positividade histológica do material do colo do útero, vagina e canal anal foi o passo seguinte. Dos blocos de parafina, foram obtidos 3 a 5 cortes de 0,2 µm, sendo desparafinado com xilol. Lavados com 100% de etanol, usado para remover traços do xilol do tecido (KHAN et al, 2007). Após os resíduos de etanol ser removidos por secagem ao ar, o tecido foi homogeneizado e em seguida adicionado 243,7 µl de (0,01M Tris-HCL, pH7,4) + 0,25% duodecil sulfato dissódico mais 6,3 µl Proteinase K (20mg/ml) incubado à 55 °C, fervido por 2-3 min, centrifugado a alta velocidade por 2 min e separado cuidadosamente a solução aquosa de aglomerados e parafina, em seguida foi usado a reação em cadeia da polimerase (PCR), para identificação de uma região do gene L1 do HPV.

O DNA extraído foi amplificado em dois sistemas de reação utilizando-se dois pares de oligonucleotídeo consensuais MY09/11 (fragmento de 450 pb) (MY09 – 5'- CGT CCAAAA GGAAACTGAGC – 3'; MY11 – 5'- GCACAGGGACATAACAATGG – 3')⁹ e GP5+/6+ (fragmento de 150 pb) (GP5+ 5'- TTTGTTACTGTGGTAGATACT AC - 3'; GP6+ 5'- GAAAAATAAACTGTAAATCATATT – 3')⁸. As condições da PCR foram estão descritas na Tabela 1. A programação de amplificação foi realizada pela: desnaturação inicial por 3min a 94°C, seguido de 34 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min, anelamento a 55°C (MY09/11) ou 45°C (GP5+/6+) por 1 min e extensão a 72°C por 1 min. A etapa de extensão final foi realizada a 72°C por 10 min. Para ambas as reações utilizou-se água ultrapura como controle negativo da reação, sendo o controle positivo uma mistura de 1µL de sangue humano acrescido de 0,25 µL do plasmídeo pBR322 contendo o genoma do HPV16. Para pesquisa do genoma do HPV16 nas amostras positivas para MY09/11 e GP5+/6+ foram realizadas amplificações com oligonucleotídeos específicos para o gene E7 (FwE7.16 5'- TTGCAGATCATCAAGAACACG-3; RvE7.16 5'- GTACCCTCTTCCCCATTGGT - 3), seguindo a mesma composição descrita na Tabela 1. O programa de amplificação foi realizado nas seguintes condições: 95°C por 2 min; 30 ciclos de 95°C por 30 seg; 54°C

por 30 seg e 72°C seg; e 72°C por 5 min. A reação foi realizada em termociclador Eppendorf® Mastercycler utilizando-se os reagentes descritos na Tabela 01. O sucesso da amplificação foi verificado por eletroforese em gel de agarose 2% (p/v), corado em 2 µl de brometo de etídio (10 mg/ml) e visualizado sob luz ultravioleta.

Tabela 1. Componentes e volumes utilizados na amplificação da região L1-HPV.

Componentes	Volume
GoTaq Green Master Mix	6,25 µL
Oligonucleotídeos (10 picomoles)	1 µL
DNA (~200 ng/µL)	1 µL
Água Ultrapura	4,25 µL

Identificação do Papillomavirus humano (HPV)

A análise estatística foi realizada pelo software Prism 5 (GraphPad Software Inc.) utilizando o teste exato de Fischer para determinar o risco relativo (RR), *odds ratio* (OR) e *p value*.

RESULTADOS

122 pacientes com patologia genital foram entrevistadas e avaliadas, sendo 114 pacientes portadores de neoplasia intra-epitelial cervical grau 3 (NIC3) e 08 pacientes diagnosticados com neoplasia intra-epitelial vaginal (NIVA2). Estes pacientes foram distribuídos em quatro faixas etárias entre 18 e 60 anos, como descrito a seguir: Grupo 18 a 25 anos, onde contabilizamos 06 mulheres; Grupo 26 a 35 anos, com 55 mulheres; Grupo 36 a 45 anos, com 36 mulheres e por último o grupo 46 a 60 anos, com 25 mulheres. A vida sexual da mulher pesquisada em relação à quantidade de parceiros durante sua vida apresentou-se da seguinte forma: 31 mulheres com um único parceiro, 23 mulheres com dois parceiros, 19 mulheres com três parceiros, 15 mulheres com quatro parceiros e cinco parceiros ou mais referido por 34 mulheres (Tabela 2).

Tabela 02. Características etárias e sexuais das pacientes HIV negativas com diagnóstico de NIC3 e NIVA2 atendidas no ambulatório de Pélvis do Hospital do Câncer de Pernambuco no período de Agosto a Dezembro de 2009.

PARÂMETRO	NÚMERO DE PACIENTES	PERCENTUAL
Faixa etária		
18-25 anos	06	4,9%
26-35 anos	55	45,1%
36-45 anos	36	29,5%
46-60 anos	25	20,5%
Parceiros sexuais		
Um	31	25,4%
Dois	23	18,8%
Três	19	15,6%
Quatro	15	12,3%
Cinco ou mais	34	27,9%
Preservativo vaginal		
Sim	01	0,8%
Não	121	99,2%
Intercurso anal		
Sim	106	86,9%
Não	16	13,1%
Preservativo anal		
Sim	12	9,8%
Não	94	91,9%
Histórico de condiloma vulvar/perianal		
Sim	13	10,6%
Não	109	89,3%

As informações sobre intercurso anal durante a vida sexual foi confirmado por 106 mulheres, enquanto 16 negaram essa prática. Quanto ao uso do preservativo no

intercurso anal, 94 mulheres negam o uso como rotina, enquanto 12 confirmaram o seu uso. Já no intercurso vaginal, a maioria das mulheres nega essa prática (99,2%), enquanto que somente uma mulher confirmou o seu uso. Antecedente de condiloma vulvar ou perianal foi negado por 110 mulheres e confirmado por 13 mulheres.

Análise cervical versus canal anal

A análise de anuscopia das 114 mulheres com lesão NIC3 detectou alteração no canal anal em 68 pacientes, com risco relativo de contrair o HPV sendo 1,2 vezes maior para mulheres com histórico de condiloma genital comparada aquelas que não relatam condiloma anterior. No grupo etário de 18 a 25 anos contabilizamos 05 mulheres, tendo uma delas histórico de condiloma genital. Neste grupo observou-se positividade para infecção pelo DNA-HPV em 03 amostras cervicais e 01 amostra anal a partir de testes moleculares (Tabela 3). No grupo de 26 a 35 anos, com 53 mulheres, apenas 03 pacientes tiveram histórico de condiloma genital. Positividade para DNA-HPV foi encontrada em 35 amostras cervicais e em 14 amostras de canal anal, sendo observada a presença de positividade para ambas as amostras cervical/anal em 08 mulheres. O risco de contrair o vírus nesta faixa etária é 1,3 vezes maior que nas demais (OR=1,9).

O Grupo de 36 a 45 anos agregou 35 mulheres, onde 04 referiram histórico de condiloma genital, com DNA-HPV detectado em 19 amostras cervicais. A análise das amostras anais revelou que 09 pacientes eram positivas para DNA-HPV, sendo 04 mulheres com amostras positivas nas áreas cervical/anal. No grupo de 45 a 60 anos com 21 mulheres, tendo um único histórico de condiloma genital, a positividade para DNA-HPV foi observada em 09 amostras cervicais e em 07 amostras do canal anal, sendo 03 amostras positivas para região cervical/anal.

Tabela 3. Histórico de condiloma genital e identificação molecular do papilomavírus humano em amostras cervicais e anais de mulheres HIV negativas com diagnóstico de NIC3, agrupadas por faixa etária.

GRUPO ETÁRIO	NÚMERO DE MULHERES	HISTÓRIA DE CONDILOMA GENITAL	DNA-HPV POSITIVO CERVICAL	DNA-HPV POSITIVO ANAL
18-25 anos	05 (4,4%)	01 (20%)	03 (60%)	01 (20%)
26-35 anos	53 (46,5%)	03 (5,7%)	35 (66,0%)	14 (26,4%)
36-45 anos	35 (30,7%)	04 (11,4%)	19 (54,3%)	09 (25,7%)
45-60 anos	21 (18,4%)	01 (4,8%)	09 (42,9%)	07 (33,3%)

Dentre as 30 mulheres com diagnóstico NIC3 que referiram um único parceiro sexual durante a vida, 20 apresentaram positividade para o DNA-HPV. Das 19 mulheres que referiram 02 parceiros, 14 apresentaram positividade para o DNA-HPV. Do grupo de mulheres com 03 parceiros, 09 mulheres foram consideradas positivas para o DNA-HPV. Quando foram referidos 04 parceiros, agruparam-se 14 mulheres com 08 amostras positivas para DNA-HPV; enquanto que dentre as 33 mulheres com 05 ou mais parceiros, 15 amostras apresentaram positividade DNA-HPV (Tabela 4).

Tabela 4. Identificação molecular do papilomavírus humano em 114 mulheres com diagnóstico histológico de NIC3 e sua relação com o número de parceiros sexuais.

NÚMERO DE PARCEIROS	NÚMERO DE MULHERES	DNA-HPV POSITIVO
01	30 (26,3%)	20 (66,7%)
02	19 (16,7%)	14 (60,9%)
03	18 (15,8%)	09 (50,0%)
04	14 (12,3%)	08 (57,0%)
5 ou (+)	33 (28,9%)	15 (45,4%)

A anuscopia em mulheres portadoras de lesão cervical NIC3 revelou: 38 mulheres com epitélio acetobranco (EAB) com positividade para o DNA-HPV em 17 amostras. A

lesão vegetante foi um achado anuscópico em apenas uma mulher, assim como a mancha hiperocrômica, sendo ambas as pacientes positivas para DNA-HPV. Leucoplasia também foi encontrada em uma única paciente, cuja amostra foi negativa para o DNA-HPV (Tabela 5).

Tabela 5. Diagnóstico anuscópico em 114 mulheres com diagnóstico de NIC3 e sua relação com a identificação molecular do papilomavírus humano.

LESÃO ANUSCÓPICA	NÚMERO DE MULHERES	DNA-HPV POSITIVO
Epitélio acetobranco	38 (33,3%)	17 (44,7%)
Lesão vegetante	01(0,9%)	01 (100%)
Leucoplasia	01 (0,9%)	-
Mancha hiperocrômica	01 (0,9%)	01 (100%)
Pontilhado	02 (1,7%)	02 (100%)
Pólipo	25 (21,9%)	10 (40%)
Sem lesões	46 (40,4%)	-

A presença do pólipo anal (Figura 1) foi observada em 25 mulheres, das quais 10 amostras foram positivas para DNA-HPV. Lesão de pontilhado esteve presente em 02 mulheres, sendo ambas as amostras positivas para DNA-HPV. A normalidade do exame anuscópico foi observada em 46 mulheres (40,4%).

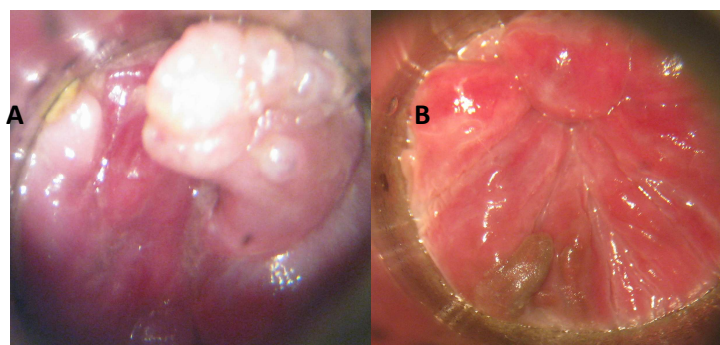


Figura 1. (A) Lesão de pólipo de canal anal em visão no exame anuscópico; (B) Lesão de mancha hiperocrômica em exame anuscópico.

Quando observados o resultado histológico das 68 amostras de canal anal de mulheres com lesão cervical, encontrou-se o condiloma genital em uma única mulher, com negatividade para o DNA-HPV na amostra analisada. Resultados semelhantes foram obtidos no diagnóstico de hipercelularidade, hiperplasia polipóide/HPV, metaplasia, NIA2-HPV e NIA3-HPV (Tabela 6).

Tabela 6. Identificação molecular do papilomavírus humano de acordo com o resultado de histologia do canal anal das 68 mulheres também diagnosticadas com NIC3.

HISTOLÓGICO CANAL ANAL	NÚMERO DE MULHERES	DNA-HPV CANAL ANAL POSITIVO
Condiloma genital	01 (1,5%)	-
Hipercelularidade	01 (1,5%)	-
Hiperplasia simples	07 (10,3%)	01 (14,3%)
Hiperplasia polipóide	15 (22,0%)	03 (20,0%)
Hiperplasia polipóide/HPV	01 (1,5%)	-
HPV	07 (10,3%)	05 (71,4%)
Inflamatório	10 (14,7%)	06 (60,0%)
Metaplasia	01 (1,5%)	-
NIA1	07 (10,3%)	04 (57,1%)
NIA1/HPV	07 (10,3%)	05 (71,4%)
NIA2	02 (2,9%)	02 (100%)
NIA2/HPV	01 (1,5%)	-
NIA3	03 (4,4%)	02 (66,7%)
NIA3/HPV	01 (1,5%)	-
Sem lesões	04 (5,8%)	03 (75,0%)

O diagnóstico histológico de hiperplasia simples foi encontrado em 07 mulheres, sendo observado EAB no exame anuscópico de 06 destas pacientes. O DNA-HPV foi encontrado em uma única amostra de hiperplasia simples com EAB. A hiperplasia polipóide foi o diagnóstico de 15 mulheres, dentre as quais 14 apresentaram lesão

polipóide no exame anuscópico e apenas uma mulher foi relacionada ao EAB. Somente em 03 amostras observou-se positividade para o DNA-HPV (20,0%).

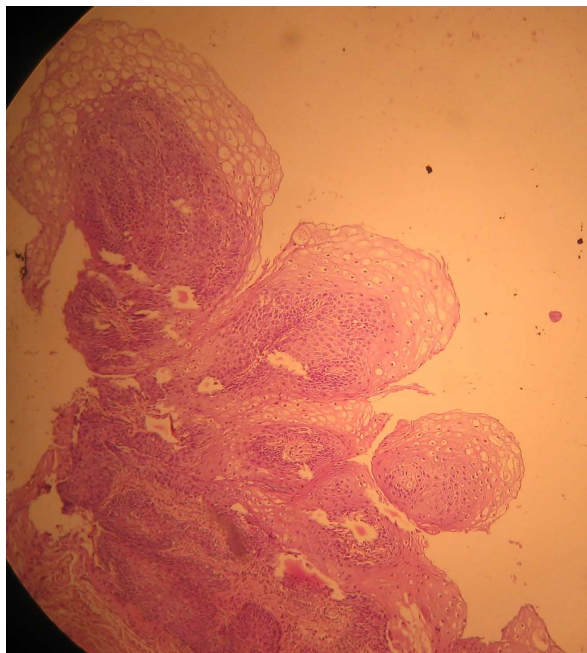


Figura 2. Lesão histológica de condiloma acuminado – material de canal anal.

HPV como diagnóstico histológico foi obtido em 07 mulheres, onde em 06 a correspondência da lesão anuscópica foi EAB, com positividade para o DNA-HPV verificado em 05 amostras. O diagnóstico histológico inflamatório foi encontrado em 10 mulheres com 06 amostras positivas para o DNA-HPV.

A NIA1 esteve presente em 07 mulheres com 04 amostras positivas para DNA-HPV. Já quando o diagnóstico de NIA1 estava associado ao HPV, que atingiu o mesmo número de mulheres, a positividade para DNA-HPV atingiu 05 amostras. Apenas 02 mulheres apresentaram diagnóstico de NIA2 sendo positivas para DNA-HPV. Quanto ao resultado de NIA3, observamos sua presença em 03 mulheres, com amostras positivas para DNA-HPV em 02 pacientes. Resultado histológico normal foi observado em 04 mulheres, sendo 03 delas positivos para o DNA-HPV.

Para as 114 mulheres com diagnóstico de NIC3 que informaram a prática de intercurso anal (99) e o uso de preservativo nessa prática (11) foi observado a presença de 07 amostras cervicais positivas para o DNA-HPV, assim como 04 amostras anais positivas. Destas amostras, somente 02 tiveram positividade para os dois sítios cervical/anal. 88 mulheres referiram não fazer uso de preservativo anal, com positividade para o DNA-HPV nas amostras cervicais de 54,5% e nas amostras anais de 28,4%. Em 11 mulheres encontramos amostras positivas para DNA-HPV em canal anal e região cervical. O intercurso anal apresentou um fator que aumenta o risco relativo de infecção pelo HPV em 1,4 vezes.

Dentre as 15 mulheres que negaram a prática do intercurso anal, o DNA-HPV foi positivo em 11 amostras cervicais e 03 amostras de canal anal, com 02 amostras positiva para ambos os sítios (Tabela 7).

Tabela 7. Identificação molecular do papilomavírus humano e sua relação com a prática de intercurso anal em 114 mulheres com diagnóstico de NIC3.

INTERCURSO ANAL	PRESERVATIVO ANAL	DNA-HPV	
		CERVICAL	ANAL
Sim 99 (86,8%)	Sim 11 (11,1%)	07 (63,6%)	04 (36,4)
	Não 88 (88,8%)	48 (54,5%)	25 (28,4%)
Não 15 (13,2%)	-	11 (73,3%)	03 (20%)

O grupo de pessoas com lesão anal que relataram ter relações com dois parceiros ao longo da vida apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,0276$). O risco relativo de contrair HPV foi maior no grupo de mulheres com apenas um parceiro durante a vida ($RR=1,21$) seguido do grupo com 5 ou mais parceiros (1,06). Este fato pode ser devido a 80% das pacientes com apenas um parceiro não fazerem uso de

preservativo anal. Já no grupo de pacientes com 02 parceiros, 64,7% não fazem uso do preservativo anal, sendo um percentual reduzido em relação aos demais grupos.

Análise vaginal versus canal anal

Considerando as 08 mulheres com NIVA2 observamos dois tipos de diagnósticos histológicos: NIVA2, encontrado em 05 mulheres, e NIVA2/HPV, observado em 03 mulheres. Amostras NIVA2 apresentaram positividade para DNA-HPV em 04 mulheres e uma única amostra de positiva em mulheres com NIVA2/HPV.

A lesão anuscópica predominante foi EAB, encontrada em 03 mulheres, enquanto que a lesão polipóide foi observada em 02 casos. Apenas um caso de lesão vegetante foi observado na anosopia. As outras duas pacientes apresentaram epitélio normal.

O grupo etário de 18 a 45 anos apresentou 04 amostras cervicais com positividade para o DNA-HPV, enquanto que o grupo de 46 a 60 anos apresentou 04 amostras cervicais, das quais 02 foram positivas para DNA-HPV (Tabela 8).

Tabela 8. Análise molecular do papilomavírus humano em mulheres com diagnóstico histológico de NIVA2 e a relação com os resultados anuscópico.

FICHA	IDADE	ANÁLISE VAGINAL		ANÁLISE ANAL		
		HISTOLÓGICO	DNA HPV	ANUSCOPIA	HISTOLOGICO	DNA HPV
14	57	NIVA2/HPV	(-)	EAB	Normal	(+)
15	45	NIVA2	(+)	Normal	-	-
18	42	NIVA2	(+)	L. vegetante	Cond. acuminado	(+)
26	35	NIVA2	(+)	EAB	Normal	(+)
74	57	NIVA2	(-)	Pólipo	Hiperplasia	(-)
79	22	NIVA2	(+)	EAB	NIA1	(-)
113	49	NIVA2/HPV	(+)	Pólipo	Hiperplasia polipóide	(+)
114	33	NIVA2/HPV	(+)	Normal	-	-

Quando observamos os resultados da análise molecular, constatamos que oligonucleotídeo MY09/11 apresentou positividade para o DNA-HPV em apenas 04 amostras cervicais, em 01 amostra anal e em nenhuma amostra vaginal. Por outro lado, o oligonucleotídeo GP5+/6+ obteve positividade para 55 amostras cervicais (83,3%), 31 amostras anais (88,6%) e todas as 06 amostras vaginais. Tanto para amostras cervicais quanto para amostras anais, houve diferença estatística significativa ($p < 0,0001$ e $p < 0,0018$, respectivamente). A positividade simultânea para MY09/11 e GP5+/6+ foi observada em 07 amostras cervicais, 03 amostras anais (Tabela 9).

Tabela 9. Eficiência de identificação do papilomavírus humano pelos oligonucleotídeos MY09/11 e GP5+/6+ para as amostras de tecido cervical, anal e vaginal.

OLIGONUCLEOTÍDEOS	AMOSTRA CERVICAL	AMOSTRA ANAL	AMOSTRA VAGINAL
MY09/11	04 (6,0%)	01 (2,8%)	-
GP5+/6+	55 (83,3%)	31 (88,6%)	06 (100%)
MY09/11 e GP5+/6+	07 (10,6%)	03 (8,6%)	-
Total	66 (57,9%)	35 (48,6%)	06 (100%)

DISCUSSÃO

Alguns estudos demonstram que a presença do HPV no canal anal em mulheres com patologia cervical, foi encontrada em 35% a 44% dos casos registrados em hospital de referência^{2,23}. Apesar de a literatura fazer referência ao câncer anal como raro, estudos demonstram um aumento progressivo de sua incidência nos últimos 10 anos^{14,16}.

A descoberta de lesões histológicas no canal anal passíveis de tratamento nas pacientes que fizeram parte dessa pesquisa, não foi uma surpresa, mas a presença de 29 mulheres com lesões histológicas anais (23,7%) não foi esperado. 22 mulheres (18,0%) foram diagnosticadas com NIA1/HPV (LSIL) enquanto que 07 mulheres (5,7%) apresentaram NIA2/3 (HSIL). Nas poucas pesquisas existentes, nacionais e internacionais, não são atingidos esses percentuais^{5,6} que foram encontrados na nossa pesquisa. A provável explicação para a existência destes resultados mais elevados passa por: falta de informações, baixa condição sociocultural⁷ e hábitos sexuais de alto risco. Estes dados levantam uma discussão principalmente no que se refere às lesões intra-epiteliais de alto grau (NIA2/3), consideradas por alguns autores como precursora do câncer anal^{11,16}.

Quando analisamos os grupos etários separadamente, observamos que a faixa etária mais atingida por lesões ginecológicas foi de 26-35 anos (45,0%), seguido pelo grupo de 36-45 (29,5%). As lesões histológicas anais pré-malignas também foram encontradas em maior percentual nestes dois grupos, com diagnóstico de NIA2/NIA3 em 06 mulheres (8,1%). Estes dados diferem parcialmente da literatura, que afirma que as mulheres na quarta e quinta décadas de vida se apresentam mais suscetível a desenvolver lesões anogenitais pré-malignas¹⁹. A causa provável parece ser o início cada vez mais precoce da atividade sexual e conseqüentemente o primeiro contato com o vírus do HPV, antecipando assim todo processo da infecção viral até as lesões precursoras do câncer anogenital.

Em relação ao grupo de 18-25 anos, observamos ausência de lesões de alto grau anal (NIA2/NIA3) e apenas a presença de um caso de NIA1, dados esses que estão em concordância ao observado na literatura mundial. Nesta faixa etária existe uma boa resposta imunológica frente à infecção viral^{19,22}, onde o vírus provavelmente ainda não

teve tempo hábil para desenvolver as lesões precursoras do câncer anal. Esta situação é reforçada pela constatação de um número reduzido de mulheres nessa faixa etária que foram incluídas na pesquisa, já que o diagnóstico histológico de NIC3 foi um pré-requisito para inclusão da paciente. O predomínio do uso de preservativo nessa faixa etária nos sugere uma maior aceitação das regras de segurança no relacionamento sexual, embora a pequena amostragem desse grupo dificulte as conclusões.

Dados alarmantes detectados na pesquisa referem-se à negativa do uso de preservativo masculino no intercuro vaginal (99,2%) e anal (86,9%). Situação de grande preocupação que nos leva a questionar a eficácia das campanhas que promovem sexo seguro pelos meios de comunicação. Quando observamos esses dados por grupo etário, constatamos que o grupo de maior risco 26-35 anos nega o uso de preservativo no intercuro anal em 83,6% e também no intercuro vaginal em 98,1%, refletindo uma clara rejeição ao uso do preservativo, provavelmente porque nessa faixa etária a existência de parceiro fixo gera uma falsa segurança e a conseqüente dispensa do uso do preservativo. Por outro lado observamos que o grupo de 18 a 25 anos, ao contrário do grupo de maior risco, apresentou um índice maior de uso de preservativo, resultados que nos sugerem que esse grupo tenha uma maior receptividade para aceitar as regras de um sexo mais seguro.

A prática do intercuro anal atingiu um percentual de 86,9%, sendo este número surpreendente, principalmente porque se acreditava que o sexo anal não fosse uma prática corrente. Os resultados demonstram claramente a necessidade urgente de mudança de condutas frente a essas mulheres. A partir destes dados, podemos reforçar as conclusões das pesquisas que apontam que o intercuro anal favorece a transmissão do vírus para o canal anal e que esse último seria um reservatório do HPV¹⁴.

De acordo com os dados levantados o número de parceiros parece não ser um fator de risco maior que a ausência do uso do preservativo, já que os resultados da pesquisa mostram um índice semelhante quando da atividade sexual, com um parceiro sexual ou com cinco/ mais.

A presença do DNA-HPV na análise da biologia molecular foi observada em 66 amostras de colo de útero (57,9%) dentre as 114 mulheres portadoras de NIC3, e em 06 das amostras vaginal (100%). Este percentual é menor que o relatado na literatura, aonde a presença do DNA-HPV nas amostras do colo do útero chegam a 97,5%²¹. Este fato pode ser devido à metodologia utilizada, no qual a retirada do HPV das amostras histológicas conservados em parafina pode levar à degradação do DNA da amostra, dificultando sua amplificação pelo PCR e resultando em dificuldade da detecção de fragmentos maiores que 200 pares de base^{4,21}.

Essa situação fica bem clara quando observamos os resultados da pesquisa, onde o maior percentual de obtenção do DNA do HPV foi com os oligonucleotídeos GP5+/6+ para 55 amostras cervicais (83,3%), 31 amostras anais (88,6%) e a totalidade (06) das amostras vaginais (100%). Quando observamos os resultados do MY09/11, cuja reação necessita de fragmentos maiores de DNA (450 pares de base), apenas 04 amostras cervicais (6,0%) e uma única amostra anal (2,8%) foram consideradas positivas para a presença do HPV.

Quando analisamos as lesões de baixo grau anal (NIA1-HPV) constatamos sua presença em 29,7% das mulheres pesquisadas enquanto que nas lesões de alto grau (NIA2/3) 5,9% foi considerada positiva. Estes percentuais são maiores que os descritos por outros autores^{5,6}. Tais divergências podem estar relacionadas às diferenças

existentes em aspectos como: realização da pesquisa em hospital de referência, situação socioeconômica dos seus freqüentadores e cultural das mulheres participantes.

O grupo etário de 46 a 60 anos foi o que apresentou o maior percentual 37,5% de mulheres com amostras de canal anal, já a positividade para o DNA-HPV atingiu as mulheres mais jovens. A região vaginal, por se encontrar próximo ao colo de útero onde as neoplasias intra-epiteliais são mais freqüentes, desperta pouca atenção para a realização de pesquisas. A positividade para o HPV foi significativa nesta amostragem vaginal e anal, apesar da baixa freqüência da lesão vaginal na amostra pesquisada que estar de acordo com o observado na literatura mundial^{17,18}.

A informação de antecedentes de condiloma genital nas mulheres pesquisadas com percentual de 10,7% reforça a idéia da circulação do vírus HPV no sistema anogenital.

A presença do DNA-HPV em 6,8% das amostras de canal anal com diagnóstico histológico sem lesões reflete a existência de lesões subclínicas do HPV que foram detectadas no exame anuscópico, mas não descoberta pelo exame histológico.

O diagnóstico histológico de hiperplasia polipóide em canal anal em 22,9% das amostras anais e positividade para o DNA-HPV em 5,4% foi um resultado inesperado, pois não é considerado um achado anormal na anosopia de magnificação e somente foi submetido à biopsia pela alta freqüência de aparecimento destas lesões em mulheres com patologia genital concomitante.

A dificuldade da detecção do DNA do HPV nas amostras histológicas conservadas em parafina se estendeu ao teste da genotipagem, que por ser um método mais sensível foi prejudicado pela fragmentação do DNA viral, além da presença de

vários resíduos deixados pela processo da retirada da parafina, dificultando ainda mais a reação.

Conclusão

A presença concomitante de neoplasia intra-epitelial genital, seja NIC3 ou NIVA2, com lesões anais provocadas pelo vírus do HPV sugerem a existência de uma circulação viral nestas regiões, viabilizando processos de lesões pré-malignas e favorecendo aparecimento de recidivas ou mesmo a progressão para lesões invasoras.

Referências

1. Araujo SEA, Cotti G, Gama AH. HPV em coloproctologia. In Rosenblantt C, Wroclawski E R, LUCON, A. M.; PEREYRA, E. A. G. HPV na prática médica. São Paulo: Atheneu, 2005.
2. Capobianco A, Silva Filho A. L, Nunes STA. Diagnóstico de HPV anal em mulheres com NIC: Prevenção de câncer do ânus? Revista Brasileira de Coloproctologia, Rio de Janeiro 2009; 29 (4)
3. Focchi J. Colposcopia. In COELHO, F. R. G et al.; Câncer do colo de útero. São Paulo: Tecmedd; 2008.
4. Fernandes JV, Meisser RV, Fernandes TAAM, Rocha LEM, Cabral ME, Villa LL. Comparação de três protocolos de extração de DNA a partir de tecido fixado em formol e incluído em parafina. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2004; 40(3): 141-6 Jun.

5. Giraldo P, Jacyntho C, Costa C, Iglesias M, Gondin C, Carvalho F, Giraldo H, Gonçalves AK. Prevalence of anal squamous intra-epithelial lesion in women presenting genital squamous intra-epithelial lesion. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2009; 142 (1): 73-5, Nov.
6. Hessol NA, Holly EA, Efird JT, Minkoff H, Schowalter JM. Anal intraepithelial neoplasia in a multisite study of HIV-infected and high-risk HIV-uninfected women. *AIDS* 2009; 23(1): 59-70.
7. Holly EA, Ralston NML, Darragh TM, Greenblatt RM, Jay N, Palefsky JN. Prevalence and risk factors for anal squamous intraepithelial lesions in women. *Journal of the National Cancer Institute* 2001; 93(11).
8. Kurman RJ, Solomon D. The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses, Baltimore: Springer, 1994.
9. Karlsen FM, Kalantari A, Jenkins E, Pettersen G, Kristensen, R, Holm B, Johansson and Hagmar B. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *Journal of Clinical Microbiology* 1996; 34: 2095- 2100.
10. Manos MM, Ting MY, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses *Cancer Cells* 1989; 7: 209-14.
11. Nadal SR, Horta SHC, Calore EE, Manzione CR. Resultados do tratamento do carcinoma espinocelular anal e do seu precursor em doentes HIV - positivos. *Revista da Associação Médica Brasileira* 2007; 53(4).
12. Nadal SR, Manzione CR, Calore EE. Lesões tumorais benignas. In Nadal SR, Manzione CR. *Proctologia na AIDS*. Rio de Janeiro: Di livros, 2007; 9-42.

13. Nadal SR, Manzione CR. Papilomavírus humano e o câncer anal. *Revista Brasileira de Coloproctologia* 2006; 26(2).
14. Palefsky J. HPV and anal cancer. HPV today 2010 (<http://www.hpvtoday.com>).
15. Palefsky JM, Holloy EA, Ralston ML, Da Costa M, Greenblatt RM. Prevalence and risk factors for anal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus (HIV) positive and high-risk HIV negative women. *Journal Infectious Diseases* 2001 183(3): 383-91.
16. Palefsky JM, Rubin M. The epidemiology of anal human papillomavirus and related neoplasia. *Obstetrics and Gynecology of North America* 2009 36(1).
17. Pereyra EAG, Parellada CI. HPV nas mulheres. In ROSENBLANTT, C et al., HPV na prática médica. São Paulo: Atheneu, 2005.
18. Robbins & Cotran, Kumar V, Abba AK, Fausto N, Stanley L. Bases da Patologia das Doenças. 7º Ed. Elsevier, 2005.
19. Ribeiro KCB. Epidemiologia do câncer do colo de útero. Fatores demográficos e fatores de risco. In Coêlho FRG et al. Câncer do colo de útero. São Paulo: Tecmedd, 2008: 18-23.
20. Shukla S, Bharti AC, Mahata S, Hussain S, Kumar R, Hedau S, C. Das B. Infection of humano papillomavirus in cânceres of different human organ sites. *Indian Journal Medical Research* 2009; 130: 222-223.
21. Simonato JFG, Nunes CM, Mlyahara GI. Avaliação de métodos de extração de DNA de material parafinado para ampliação em PCR. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2007; 43(2): 121-127, Abril.

22. Roteli-Martins CM, De Carvalho NS, Naud P, Teixeira J, Borba P, Derchain NS, Tyring S, Gall S, Diaz A, Blatter M, Shier RM, Romanowski B, Quint WG, Issam C, Calindo C, Schuind A, Dubin G. Prevalence of human papillomavirus infection and associated risk factors in Young women in Brazil, Canada, and the United States: A multicenter cross-sectional study. *International Journal of Gynecological Pathology* 2011; 30(2):173-184.
23. Véo CAR, Saad SS, Nicolau SM, Melani AGF, Denadai MVA. Study on the prevalence of human papillomavirus in the anal canal of women with cervical intraepithelial neoplasia grade III. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2008; 140(1):103-7.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento, através de artigos científicos, do aumento nos últimos anos da incidência do câncer anal na população feminina mundial, vem possibilitando uma melhor compreensão da epidemiologia das neoplasias intra-epitelial anal precursora do câncer anal.

A evidência na pesquisa da contribuição do HPV na promoção das NIAs e a clara distribuição do vírus pelo sistema anogenital feminino produzindo lesões multifocais, mostra a necessidade de repensar a rotina ginecológica de mulheres que apresentem neoplasias intra-epitelial genital prévia. A indicação do exame de anoscopia de magnificação deve fazer parte desta rotina nas mulheres com NIC3 e NIVA2, lesões consideradas precursoras do câncer do colo de útero e da mucosa vaginal respectivamente, principalmente no grupo de risco 26 a 35 anos, onde foi observada a maior quantidade de lesões pré-malignas e a presença do DNA-HPV.

As lesões vaginais são pouco estudadas, principalmente devido a sua baixa incidência, mas como observado na pesquisa, mulheres com diagnóstico de NIVA2 apresentaram positividade elevada para o HPV. Embora não se possa ter uma avaliação estatística devido à pequena amostragem vaginal, acreditamos assim como observado nas mulheres com NIC3, há risco de desenvolver neoplasia intra-epitelial anal nestas pacientes.

Observamos uma frequência acima da média de pólipos em canal anal em mulheres com diagnóstico de NIC3 e NIVA2 e constatamos em algumas amostras a presença do HPV, sendo pertinente considerar esta infecção neste tipo de lesão durante o exame anoscópico para ampliar o conhecimento das infecções neste tecido.

A confirmação da prática do intercurso anal e vaginal associado à negativa do uso de preservativo na maioria das mulheres que participaram da pesquisa torna

imperativo repensar a abordagem dos meios de comunicação que visam difundir a idéia de sexo seguro.

O resultado obtido para DNA-HPV no canal anal foi abaixo da média descrita na literatura mundial. Existe a possibilidade que este quadro possa ter sido ocasionada pelo uso de amostras histológicas em bloco de parafina, cujo processo para retirada da parafina pode ter provocado a degradação do DNA viral, dificultando o registro da sua presença e a genotipagem.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AMATO, V. N.; CASADEI, C. R. M.; ROSSITTO, S. T., DIAS, M. D.; LEVI, G. C. Apreciação sobre prova rápida imunocromatográfica para diagnóstico de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). **Revista Brasileira de Clínica Terapêutica**, v. 26, n. 1, p. 13-15, jan. 2000.
- ARAUJO, S. E. A.; COTTI, G.; GAMA, A. H. HPV em coloproctologia. In ROSENBLANTT, C.; WROCLAWSKI, E. R.; LUCON, A. M.; PEREYRA, E. A. G. HPV na prática médica. São Paulo: **Atheneu**, 2005.
- BARZON, L.; MILITELLO, V.; PAGNI, S.; FRANCHIN, E.; DAL BELLO, F.; MENGOLI, C.; PALÚ. Distribution of human papillomavirus types in the anogenital tract of females and males. **Journal of Medical Virology**, v.82, n. 8 p. 1424-30, Aug. 2010.
- BERNARD, H.-U.; BURK, R. D.; CHEN, Z.; DOORSLAER, K. V.; HAUSEN. H. Z.; VILLIERS, E.-M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, article in press. 2010.
- COUTINHO, J. R. H. Rastreamento de lesões pré-neoplásicas do ânus. Citologia anal e anoscopia de alta resolução novas armas para prevenção. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 5, set/out. 2006.
- CARTIER, R., CARTIER, I. Colposcopia prática. ed. 3. São Paulo: **Roca**, 1994.
- CRUM, C. P. Aparelho genital feminino. In Robbins e Cotran, Robbins, S. L.; Cotran, V. Patologia-Bases Patológicas das Doenças. ed. 7. São Paulo: **Elsevier**, 2005. P.1117-1119.
- COELHO, F. R. G.; SOARES, F. A.; FOCCHI, J.; FREGNANI, J. H. T. G.; ZEFERINO, L. C.; VILLA, L. L.; FEDERICO, M. H.; NOVAS, P. E. R. S.; COSTA, R. L. R. Câncer do colo do útero. São Paulo: **Tecmedd**, 2008.
- CAPOBIANGO, A.; SILVA FILHO, A. L.; NUNES. T. A. Diagnóstico de HPV anal em mulheres com NIC: Prevenção de câncer do ânus? **Revista Brasileira de Coloproctologia**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 4, Oct./Dec. 2009.

CAMARGO, M.; SOTO-DE LEON, S. C.; SANCHEZ, R.; PEREZ-PRADOS, A.; PATARROYO, M. E, PATARROYO, M. A. Frequency of human papillomavirus infection, and association with different risk factors in Colombia. **Annals of Epidemiology**, v. 21, n.3, p. 204-13, Mar. 2011.

DE VUYST, H.; CLIFFORD, G. M.; NASCIMENTO; M. C.; MADELEINE, M. M.; FRANCESCHI, S. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of vulva, vagina and anus: a meta-analysis. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 7, p. 1626-36, Apr. 2009.

DOBO, C.; OSHIMA, C. T. F.; GIANNOTTI, O. F. Método de hibridização in situ em detecção de infecção pelo papiloma humano (HPV) em regiões de vulva, vagina e colo uterino. **Folha Médica**, Rio de Janeiro, v. 121, n. 3, p. 154-164, jul/set. 2002.

DUARTE, G.; GONÇALVES, C. V.; MARCOLIN, A. C.; PASCOHOINI, M. C.; QUINTANA, S. M.; MUSSI PINHATA, M. M. Teste rápido para detecção da infecção pelo HIV-1 em gestantes/Rapid test to detect HIV-1 infection among pregnant women. **Revista Brasileira de Ginecologia**, v. 23, n. 2, p.107-111, mar. 2001.

FOCCHI, J. Colposcopia. In COELHO, F. R. G et al.; Câncer do colo de útero. São Paulo: **Tecmedd**, 2008.

GLOBOCAN 2008 (IARC) [*Section of Cancer Information*](#) (23/2/2011)

GOMPEL, C.; KOSS, L. G. Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas. São Paulo: **Manole**, 1997.

GIRALDO, P.; JACYNTHO, C.; COSTA, C.; IGRESIAS, M.; GONDIM, C.; CARVALHO, F.; GIRALDO, H.; GONÇALVES, A. K. 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, p. 73-5, Nov. 2009.

HOLLY, E. A.; RALSTON, M. L.; DARRAGH, T. M.; GREENBLATT, R. M.; JAY, N.; PALEFSKY, J. N. Prevalence and risk factors for anal squamous intraepithelial lesions in women. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, n. 11, Jun. 2001.

HESSOL, N. A.; HOLLY, E. A.; EFIRD, J. T.; MINKOFF, H.; SCHOWALTER, J. M. Anal intraepithelial neoplasia in a multisite study of HIV-infected and high-risk HIV-uninfected women. **AIDS**. v. 23, n. 1, p. 59-70, Jan. 2009.

HOSSNE, R. S. Prevalência de papilomavírus (HPV) perianal assintomáticos em pacientes portadores de HPV genital tratados no Hospital das Clinicas da faculdade de medicina de Botucatu. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 2, abr/jun. 2008.

INSINGA, R. P.; PEREZ, G.; WHEELER, C. M.; KOUTSKY, L. A.; GARLAND, S. M.; LEODOLTER, S.; JOURA, E.A.; FERRIS, D. G.; STEBEN, M.; HERNANDEZ-AVILA, M.; BROWN, D. R.; ELBASHA, E.; MUÑOZ, N.; PAAVONEN, J.; HAUPT, R. M.; for the FUTURE I Investigators. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 20, n. 2, p. 287-296, Mar. 2011.

JACYNTHO, C.; ALMEIDA FILHO, G.; MALDONADO, P. HPV infecção genital feminina e masculina, Rio de Janeiro: **Revinter**, 1994.

KARLSEN, F. M.; KALANTARI, A.; JENKINS, E.; PETTERSEN, G.; KRISTENSEN, R.; HOLM, B.; JOHANSSON, and B. HAGMAR. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, n.34, p. 2095- 2100. 1996.

KURMAN, R. J.; SOLOMON, D. The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses, Baltimore: **Springer**, 1994.

KAUSHIC, C.; ROTH, K. L.; ANIPINDI, V.; XIU, F. Increased prevalence of sexually transmitted viral infections in women: The role of female sex hormone in regulating susceptibility and immune responses. **Journal of Reproductive immunology**. Article in press. Feb. 2011.

LÓPEZ, M.J.; ILI, G. C.G.; BREBI, M, P.; GARCIA, M, P.; CAPURRO, V, I.; GUZMÁN, G. P.; SUÁREZ, P. E.; OJEDA, F. J. M.; ROA, S. J. C. Human papillomavirus genotyping of cervical uterine preneoplastic lesions in a high risk area. **Revista Médica de Chile**, v. 138, n. 11, p. 1343-1350, nov. 2010.

MANOS, M. M.; TING, M.Y.; WRIGHT, D. K.; LEWIS, A. J.; BROKER, T. R.; WOLINSKY, S. M. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Cancer Cells**, v. 7, 209-14, 1989.

MAGI, J. C.; MAGI, D. A. S.; RECHE, L. M. C.; FALAVINHA, T.; CARVALHO, G. T. Anuscopia com exacerbação para diagnóstico de papilomavírus humano ano-retal na forma subclínica. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 22, n. 3, p. 178-183, 2002.

MAGI, J. C.; RODRIGUES, M. R. S.; MORENO, W. D. M.; FRAGA, B. P.; COSTA, A. C. L.; FORMIGA, G. J. S. A importância da anuscopia de alta resolução para diagnóstico do papilomavírus humano anorretal na forma subclínica, das lesões anais intra-epiteliais e do carcinoma “in situ” anal. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 1, jan/fev. 2004.

MIRANDA, D.; PAULINO JUNIOR, E.; CASTRO, L. P. F.; PEDROSA, M. S. Sistema genital feminino. In BOGLIOLO, L. *Bogliolo patologia*. ed. 7. Rio de Janeiro: **Guanabara Kookan**, 2006. p. 554-589.

MCCLOSKEY, J. C.; METCALF, C.; FREXMAN, J. P.; BURKE, V.; BEILIN, L. J. The frequency of high- grade intraepithelial neoplasia in anal/perianal warts in higher than previously recognized. **Internation Journal of STD & AIDS**, England, v. 18, n. 8, p. 538-42, Aug. 2007.

NADAL, S. R.; MANZIONE, C. R. Uso do colposcopio para avaliar a região perianal e o canal anal - padronização técnica da nomenclatura e indicações. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 24, n. 4, p. 379-381, 2004.

NADAL, S. R.; MANZIONE, C. R. Papilomavírus humano e o câncer anal. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 2, abr/jun. 2006.

NADAL, S. R.; MANZIONE, C. R. Vacina contra o papilomavírus humano. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 3, p. 337-340. ago. 2006.

NADAL, S. R.; MANZIONE, C. R. Proctologia na AIDS, Rio de Janeiro: **Di livros**, 2007.

NADAL, S. R.; MANZIONE, C. R.; HORTA, S. H. C.; TANAKA, P. Y. Neoplasias Malignas. In NADAL, S.R.; MANZIONE, C. R. Proctologia na AIDS. Rio de Janeiro: **Di livros**, 2007. p. 81-106.

NADAL, S. R.; MANZIONE, C. R.; CALORE, E. E. Lesões tumorais benignas. In NADAL, S. R.; MANZIONE, C. R. Proctologia na AIDS. Rio de Janeiro: **Di livros**, 2007. p. 9-42.

NADAL, S. R.; HORTA, S. H. C.; CALORE, E. E.; MANZIONE, C. R. Resultados do tratamento do carcinoma espinocelular anal e do seu precursor em doentes HIV - positivos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 53, n. 4, jul/ago. 2007.

PEREYRA, E. A. G.; PARELLADA, C. I. HPV nas mulheres. In ROSENBLANTT, C et al., HPV na prática médica. São Paulo: **Atheneu**, 2005.

PALEFSKY, J. HPV and anal cancer. **HPV today** 2010 (<http://www.hpvtoday.com>).

PALEFSKY, J. M.; HOLLY, E. A., RALSTON, M. L.; DA COSTA, M.; GREENBLATT, R. M. Prevalence and risk factors for anal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus (HIV) positive and high-risk HIV negative women. **Journal Infectious Diseases**, v.183, n.3, p. 383-91, 2001.

RUBIN, M. The epidemiology of anal human papillomavirus and related neoplasia. **Obstetrics and Gynecology of North America**, v. 36. n. 1. Mar. 2009.

ROSENBLANTT, C.; WROCLAWSKI, E. R.; LUCON, A. M.; PAREYRA, E. A. G. HPV na prática médica. São Paulo: **Atheneu**, 2005.

RIBEIRO, K. C. B. Epidemiologia do câncer do colo de útero. Fatores demográficos e fatores de risco. In COÊLHO, F. R. G et al. Câncer do colo de útero. São Paulo: **Tecmedd**, 2008. p. 18-23.

ROTELI-MARTINS, C. M.; DE CARVALHO, N. S.; NAUD, P.; TEIXEIRA, J.; BORBA, P.; DERCHAIN, S.; TYRING, S.; GALL, S.; DIAZ, A.; BLATTER, M.; SHIER, R. M.; ROMANOWSKI, B.; QUINT, WG.; ISSAM, C.; CALINDO. C.; SCHUIND. A.; DUBIN, G. Prevalence of human papillomavirus infection and associated risk factors in Young women in Brazil, Canada, and the United States: A

multicenter cross-sectional study. **International Journal of Gynecological Pathology**, v. 30, n. 2, p. 173-184, Mar. 2011.

SANTOS, J. C. M. Câncer ano-reto-cólico- aspectos atuais: I – Câncer anal. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 2, abr/jun. 2007.

SALGADO, C.; RIEPER, J. P. Colposcopia. ed. 4. Rio de Janeiro: **FAE**, 1984.

SICHERO, L.; VILLA, L. L. Biologia do HPV. In COELHO, F.R.G et al. Câncer do colo do útero. São Paulo: **Tecmedd**, 2008. p. 58-66.

SOARES, F. A. In COELHO, F. R.G et al. Câncer do colo do útero. São Paulo: **Tecmedd**, 2008. p. 229-320.

SHUKLA, S.; BHARTI, A.C.; MAHATA,S.; HUSSAN, S.; KUMAN, R.; C. DAS. Infection of human papillomaviruses in cancers of different human organ sites. *Indian Journal of Medical Research*. v. 130 p. 222-233, Sept. 2009.

VÉO, C. A. R.; SAAD. S, S.; NICOLAU, S, M.; MELANI. A. G. F.; DENADAI. M. V.A. Study on the prevalence of human papillomavirus in the anal canal of women with cervical intraepithelial neoplasia grade III. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.140, n. 1, p. 103-7, Sep. 2008.

VARGAS, P. R. M. Diagnóstico histológico das neoplasias escamosas intra-epiteliais e invasivas. In Coelho et al. Câncer do colo do útero. São Paulo: **Tecmedd**, 2008. p. 321-359.

ZAMPIROLO, J. A.; MERLIN, J. C.; MENEZES, M. E. Prevalência de HPV de baixo e alto risco pela técnica de biologia molecular (Captura hibrida 2) em Santa Catarina. **Revista Brasileira de Analise Clinica**, Florianópolis, v. 39, n. 4, p. 265-268. Maio. 2007.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Formulário coleta de dados

APÊNDICE A
FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS

Nº _____ HIV Negativa em _____

Data _____

REGISTRO: _____

NOME: _____

IDADE: _____ Parceiros nº _____ Intercurso anal Sim Não

Camisinha intercurso vaginal Sim Não Camisinha intercurso anal Sim Não

História de condiloma em região vulvar ou perianal sim não

Citologia nº _____ Resultado

Colposcopia data _____ Resultado

Histologia nº _____ Data _____

Resultado _____

Anuscopia de magnificação Data _____

Resultado do Histológico (canal anal)

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

APÊNDICE B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, RG: _____, declaro, por meio deste termo, que concordei em ser entrevistada na pesquisa de campo intitulada Lesões provocadas pelo HPV em mucosas anogenital em pacientes HIV negativas; a pesquisa é coordenada pela médica Maria das Graças de F. C. Castor, a quem poderei contatar a qualquer momento que julgar necessário através do telefone 99617168 ou e-mail castor@smartsat.com.br

Após receber explicações da pesquisadora, da necessidade de realizar exames para confirmar a existência da lesão pré-maligna do colo de útero ou vagina, que foi sugerido pelo preventivo; concordei em realizar a colposcopia, onde deitada em posição ginecológica, será introduzido o espelho no canal vaginal, para observar colo de útero e vagina e na presença de “mancha” realizar a biópsia, anestesiando se necessário. Entendi e concordo, quando a pesquisadora sugeriu a realização do exame de colposcopia do canal anal, com a introdução do anuscópio no anus, tendo a finalidade de afastar a existência de lesões pré-malignas e na presença de “manchas” realizar a biópsia sob anestesia; assim como autorizo a coleta de sangue para o teste de HIV (vírus da AIDS).

Estou ciente que a realização dos exames pode provocar desconforto ou dor leve, quando da introdução dos instrumentos ou mesmo a picada da agulha da anestesia ou coleta de sangue, mas entendo que, os procedimentos realizados são necessários tendo em vista a possibilidade de cura, caso seja detectado alguma lesão pré-maligna.

Afirmo que aceitei participar por minha própria vontade, sem receber qualquer incentivo financeiro e com a finalidade exclusiva de colaborar para o sucesso da pesquisa. Fui informada dos objetivos estritamente acadêmicos do estudo.

Foi também esclarecido que os usos das informações por mim oferecidas estão submetidos às normas de ética em pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde.

Compreendo que minha identidade será mantida em sigilo e que os resultados da pesquisa poderão ser apresentados em eventos e publicações científicas.

Estou ciente de que, caso eu tenha dúvida poderei contatar a pesquisadora ou ainda o comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Pernambuco, situado na Av. Cruz Cabugá, 1597- Santo Amaro /Recife- (081) 32178197.

Fui ainda informada que minha participação na pesquisa poderá ser interrompida, se eu assim o desejar, sem sofrer nenhum constrangimento ou qualquer prejuízo para meu tratamento, seja tratamento clínico ou cirúrgico.

A pesquisadora me ofereceu uma cópia assinada deste termo de consentimento Livre e Esclarecido, conforme recomendações da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Recife, _____ de _____ 2009

Assinatura do participante _____

Testemunhas

1 _____

2 _____

Assinatura da pesquisadora _____

APÊNDICE C - Termo de Autorização de Imagem

APÊNDICE C

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE USO DE IMAGEM

Eu _____,
CPF _____, RG _____, depois de conhecer e entender os objetivos, procedimentos metodológicos, riscos e benefícios da pesquisa, bem como de estar ciente da necessidade do uso de minha imagem, **AUTORIZO**, através do presente termo, a pesquisadora responsável, a médica Maria das Graças de F. C. Castor do projeto de pesquisa intitulado “Lesões provocadas pelo HPV em mucosas anogenital em pacientes HIV negativas” a realizar as fotos que se façam necessárias. Ao mesmo tempo libero a utilização destas imagens para fins científicos e de estudos (Congressos, Palestras, seminários), **a título gratuito e sem limite de prazo**, em favor da pesquisadora da pesquisa, acima especificada.

Recife, ____ de _____ de 2009

Participante da pesquisa

Pesquisador responsável pelo projeto

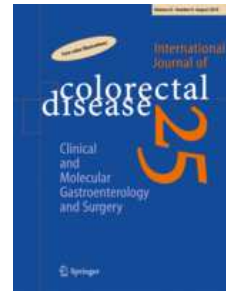
ANEXOS

ANEXO A – Normas da *International Journal of Colorectal Diseases*

Instructions for Authors

Types of papers

Types of Papers:



Original Research Articles

Reviews (usually commissioned but may also be submitted)

Case Reports

Letters to the editor (Letters to the editor should not include references)

Protocols on clinical studies

Congress Reports

Meeting Abstracts

Book Reviews

Announcements

Editorial Procedure

If you have any questions please contact:

H. J. Buhr (Editor-in-Chief)
 Chirurgischen Klinik und Poliklinik I
 Charité - Universitätsmedizin Berlin
 Campus Benjamin Franklin
 Hindenburgdamm 30
 12200 Berlin, Germany
 Fon: +49-30-8445-2541
 Fax: +49-30-8445-2740
 eMail: heinz.buhr@charite.de

Manuscript submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title page

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

Purpose (stating the main purposes and research question)
 Methods
 Results
 Conclusions

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations. Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.

Save your file in doc format. Do not submit docx files.

Word template (zip, 154 kB)

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

Scientific style

Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square

brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

Journal article Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8 Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted: Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

Article by DOI Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

Book South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 2 kB)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file spbasic.bst which is included in Springer's LaTeX macro package.

Tables

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones,

please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not

distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain

information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.

If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make

specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.

Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material

Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Integrity of research and reporting

Ethical standards

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki. It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.

The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the

above-mentioned requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements.

Conflict of interest

Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. This note should be added in a separate section before the reference list.

If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, they agree to the Springer Open Choice Licence.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

ANEXO B – Comprovante de submissão do artigo

De: "Editorial Office" <ijcd@charite.de>
Assunto: **IJCD: A manuscript number has been assigned to HPV and pre-cancerous lesions of anal canal in women: Systematic review**
Data: 22 de fevereiro de 2011 13:11:45 BRT
Para: "Danyelly Bruneska G Martins" <bruneska@prospecmol.org>

Dear Dr G Martins,

Your submission entitled "HPV and pre-cancerous lesions of anal canal in women: Systematic review" has been assigned the following manuscript number: IJCD-D-11-00103.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.
The URL is <http://ijcd.edmgr.com/>.

Thank you for submitting your manuscript to the International Journal of Colorectal Disease.

Kind regards,

Editorial Office
International Journal of Colorectal Disease

Gynecologic Oncology, an international journal, is devoted to the publication of clinical and investigative articles that concern tumors of the female reproductive tract. We welcome the submission of investigations relating to the etiology, diagnosis, treatment, and prevention of female cancers, as well as research from any of the disciplines related to this field of interest. Research areas include: cell and molecular biology, chemotherapy, clinical trials, epidemiology, genetics, immunology and vaccines, 'omics', pathology and cytology, quality of life, radiation therapy, surgery, and translational research. All aspects of scholarship related to tumors of this region are welcome, with originality, quality, and clarity the chief criteria of acceptance.



Types of Articles

Original Research Report: Full-length report of an original basic or clinical investigation.

Review Article: A comprehensive and scholarly review of the literature relating to an important basic or clinical subject, accompanied by critical analysis and leading to reasonable conclusions.

Letter to the Editor: May consist of either of two types of correspondence: (1) a question or challenge to article published recently in the journal or (2) a brief communication describing a preliminary research report or a review.

Editorial: Commentary on an original article published in the same issue or an opinion or perspective on a specific topic.

Clinical Commentary: Offers perspective or opinion of clinical relevance.

Rapid Communication: For papers, which will usually be primary research (Articles), judged to warrant fast dissemination, *Gynecologic Oncology* can publish a peer-reviewed manuscript in the journal in as little as 12 weeks of receipt, after full clinical/scientific and statistical review. Authors should outline the case for rapid publication in their covering letter to the Editors.

Case Report: A brief description of up to three cases of a particular condition that is unusual and also provides new insights into diagnosis or clinical management.

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Clinical Trial Guidelines

We invite submission of all clinical trials, whether phase I, II, or III. For phase I trials, we especially encourage those of a novel substance for a novel indication, if there is a strong or unexpected beneficial or adverse response, or a novel mechanism of action. Systematic reviews of randomised trials also might warrant rapid peer review and publication. We

encourage the registration of all interventional trials, whether early or late phase, in a primary register that participates in WHO's International Clinical Trial Registry Platform. We also encourage full public disclosure of the minimum 20-item trial registration dataset at the time of registration and before recruitment of the first participant (<http://www.who.int/ictpr/en/>). The registry must be independent of for-profit interest. Reports of randomised trials must conform to revised CONSORT guidelines, and should be submitted with their protocols. All reports of clinical trials must include a summary of previous research findings, and explain how this trial contributes to the sum of knowledge. The relation between existing and new evidence should be shown by direct reference to an existing systematic review and meta-analysis; if neither exists, authors are encouraged to do their own, or to describe the qualitative association between their research and previous findings.

- Cluster randomised trials must be reported according to CONSORT extended guidelines.
- Randomised trials that report harms must be described according to extended to extended CONSORT guidelines.
- Studies of diagnostic accuracy must be reported according to STARD guidelines.
- Systematic reviews must be written according to the Cochrane Collaboration guidelines.
- Observational studies (cohort, case-control, or cross-sectional designs) must be reported according to the STROBE statement.

Conflict of Interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within 24 months of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Gynecologic Oncology requires full disclosure of all potential conflicts of interest. All authors must complete and sign the official *Gynecologic Oncology* conflict of interest form, which may be found [here](#). Each and every author must disclose any potential conflict of interest as defined on the form itself.

The conflict of interest form may be submitted in several ways: 1) download the form, have all authors place an official digital signature on the form, and upload it to your submission; 2) download the form, print it out, hand sign it, scan the signed form, and upload the scanned file to your submission; or 3) download the form, hand sign it, and fax all signed forms together to +1 (619) 699-6211. Please ensure that if you fax the forms, you gather all forms and fax them together *before* approving your submission.

You will receive confirmation of receipt for all conflict of interest forms. If signed conflict of interest forms are not provided upon submission, your submission will be returned to you with a request that you provide signed forms for all authors. Your manuscript will not be considered for publication by editors or reviewers until all signed conflict of interest forms have been received.

Role of Medical Writer or Editor

If a medical writer or editor was involved in the creation of your manuscript, we need a signed statement from the corresponding author to include their name and information about funding of this person. This information should be added to the Acknowledgement section. We also require signed statements from any medical writers or editors declaring that they have given permission to be names as an author; or in the Acknowledgments section.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection software iThenticate. See also <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be

sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions.

Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the Funding Source

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author,

including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language Services

Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit

<http://www.elsevier.com/languagepolishing> or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com> for more information. Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these).

Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions: <http://www.elsevier.com/termsandconditions>

Submission

Submission to this journal proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the homepage of this journal (<http://www.elsevier.com/journals>) you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail.

It is a condition of publication that all manuscripts must be written in clear, grammatical English and be submitted to the *Gynecologic Oncology* Web site at <http://ees.elsevier.com/ygyno>. Authors are requested to transmit the text and art of the manuscript in electronic form to this address. Each manuscript must also be accompanied by a cover letter. (Please see Preparation of Manuscript below.) If you are unable to provide an electronic version, please contact the editorial office prior to submission by e-mail (gyn@elsevier.com), telephone +1 619 699 6767, or fax +1 (619) 699 6211.

Manuscripts are accepted for review with the understanding that no substantial portion of the study has been published or is under consideration for publication elsewhere and that its submission for publication has been approved by all of the authors and by the institution where the work was carried out. Authors must disclose prior presentation at a public scientific meeting as a footnote on the title page.

Manuscripts that do not meet the general criteria or standards for publication in *Gynecologic Oncology* will be immediately returned to the authors, without detailed review.

Please follow this link for a detailed list of the submission requirements and how to structure your article: [Check List for Authors](#)

Essential title page information

Please follow this link for a detailed list of the submission requirements and how to structure your article: [Check List for Authors](#)

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Research highlights

Research highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Research highlights' in the file name and include 2 to 3 bullet points (maximum 20 words per bullet point). See <http://www.elsevier.com/researchhighlights> for examples.

Electronic artwork

Please follow this link for a detailed list of the submission requirements and how to structure your article: [Check List for Authors](#)

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Submission Checklist

Please follow this link for a detailed list of the submission requirements and how to structure your article: [Check List for Authors](#)

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at

<http://epsupport.elsevier.com..>

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to

Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

ANEXO D – Regulamentação da defesa e normas de apresentação



Universidade Federal de Pernambuco
Programas de Pós-Graduação
do Centro de Ciências da Saúde

Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife – PE



DISSERTAÇÃO (mestrado) E TESE (doutorado)

REGULAMENTAÇÃO DA DEFESA E NORMAS DE APRESENTAÇÃO

I - REGULAMENTAÇÃO DA DEFESA

O aluno do Programa da Pós-Graduação /CCS/UFPE deve:

- 1 Apresentar a dissertação em formato de artigos*, dos quais pelo menos um artigo deve ser enviado para publicação em revista indexada no mínimo como Qualis Nacional A da CAPES. O formato de apresentação dos artigos segue as normas de “instruções aos autores” das Revistas que serão submetidos. A revisão da literatura pode ser apresentada sob a forma de artigo de revisão a ser submetido à publicação.
- 2 Apresentar a tese em formato de artigos, dos quais pelo menos dois artigos devem estar submetidos à publicação em revistas indexadas no mínimo como Qualis Nacional A da CAPES. O formato de apresentação dos artigos segue as normas de “instruções aos autores” das Revistas que são submetidos (apresentar comprovantes para a defesa de tese). A revisão da literatura pode ser apresentada sob a forma de artigo de revisão também submetido à publicação.

II NORMAS DA APRESENTAÇÃO¹

ESTRUTURA	ORDEM DOS ELEMENTOS
1 Pré-textuais Elementos que antecedem o texto com informações que ajudam na identificação e utilização do trabalho.	1.1 Capa 1.2 Lombada 1.3 Folha de rosto 1.4 Errata (opcional, se for o caso) 1.5 Folha de aprovação 1.6 Dedicatória(s) 1.7 Agradecimento(s) 1.8 Epígrafe (opcional) 1.9 Resumo na língua vernácula 1.10 Resumo em língua estrangeira 1.11 Lista de ilustrações 1.12 Lista de tabelas 1.13 Lista de abreviaturas e siglas 1.14 Lista de símbolos 1.15 Sumário
2 Textuais	2.1 Apresentação 2.2 Revisão da literatura (ou artigo de revisão) 2.3 Métodos 2.4 Resultados - Artigo (s) original (ais) 2.5 Considerações finais
3 Pós-textuais	3.1 Referências 3.2 Apêndice (s)

²Adaptadas segundo as recomendações da ABNT NBR 14724, 2005

(NBR 14724: informação e documentação: trabalhos acadêmicos: apresentação. Rio de Janeiro, 2005).

b) Contracapa

Elementos que complementam o trabalho	3.3 Anexo (s)
---------------------------------------	---------------

1 Pré-textuais

1.1 Capa

Proteção externa do trabalho e sobre a qual se imprimem as informações indispensáveis à sua identificação

a) Anverso (frente)

Cor: Verde escura;

Consistência: capa dura

Formatação do texto: letras douradas, escrito em maiúsculas, fonte “Times New Roman”, tamanho 16, espaço duplo entre linhas, alinhamento centralizado.

Conteúdo do texto: na parte alta deve ser colocado o nome do doutorando ou mestrando; na parte central deve ser colocado o título e o subtítulo (se houver) da Tese ou Dissertação; na parte inferior deve ser colocados o local (cidade) da instituição e ano da defesa.

Anverso (Frente)

Cor: branca;

Formatação do texto: letras pretas, escrito em maiúsculas e minúsculas, fonte “Times New Roman”, tamanho 16, espaço duplo entre linhas, alinhamento centralizado.

Conteúdo do texto: na parte alta deve ser colocado o nome do doutorando ou mestrando; na parte central deve ser colocado o título e o subtítulo (se houver) da Tese ou da Dissertação, sendo permitida ilustração; na parte inferior deve ser colocados o local (cidade) da instituição e ano da defesa.

Observação: As capas verdes e sólidas serão somente exigidas quando da entrega dos volumes definitivos, após aprovação das respectivas bancas examinadoras e das respectivas correções exigidas.

1.2 Lombada

Parte da capa do trabalho que reúne as margens internas das folhas, sejam elas costuradas, grampeadas, coladas ou mantidas juntas de outra maneira.

De baixo para cima da lombada devem estar escritos: o ano, o título da Tese ou da Dissertação, o nome utilizado pelo doutorando ou mestrando nos indexadores científicos.

1.3 Folha de Rosto

Anverso (frente)

Cor: branca;

Formatação do texto: letras pretas, escrito em maiúsculas e minúsculas, fonte “Times New Roman”.

Conteúdo do texto: os elementos devem figurar na seguinte ordem:

- a)** nome do doutorando ou mestrando (na parte alta fonte “Times New Roman”, tamanho 16, alinhamento centralizado);
- b)** título da Tese ou Dissertação. Se houver subtítulo, deve ser evidenciada a sua subordinação ao título principal, precedido de dois-pontos (na parte média superior, fonte “Times New Roman”, tamanho 16, espaço duplo entre linhas, alinhamento centralizado);
- c)** natureza, nome da instituição e objetivo, explícito pelo seguinte texto: “Tese ou Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor ou Mestre em Patologia” (na parte média inferior, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, espaço simples entre linhas, devem ser alinhados do meio da mancha para a margem direita);
- d)** o nome do orientador e se houver, do co-orientador (logo abaixo do item c, separados por dois espaços simples, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhamento à esquerda);
- e)** local (cidade) da instituição (na parte inferior, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhamento centralizado);
- f)** ano da defesa (logo abaixo do item e, sem espaço, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhamento centralizado)

Verso

Descrever a ficha catalográfica, segundo as normas da Biblioteca Central da UFPE.

1.4 Errata

Esta folha deve conter o título (Errata), sem indicativo numérico, centralizado, sendo elemento opcional que deve ser inserido logo após a folha de rosto, constituído pela referência do trabalho e pelo texto da errata e disposto da seguinte maneira:

EXEMPLO ERRATA

Folha	Linha	Onde se lê	Leia-se
-------	-------	------------	---------

1.5 Folha de Aprovação

Elemento obrigatório, colocado logo após a folha de rosto, escrito no anverso da folha (cor branca), não deve conter o título (folha de aprovação) nem o indicativo numérico, sendo descrito em letras pretas, maiúsculas e minúsculas, fonte “Times New Roman”, constituído pelos seguintes elementos:

- a)** nome do doutorando ou mestrando (na parte alta fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhamento centralizado);
- b)** título da Tese ou Dissertação. Se houver subtítulo, deve ser evidenciada a sua subordinação ao título principal, precedido de dois-pontos (na parte média superior, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, espaço duplo entre linhas, alinhamento centralizado);
- c)** data de aprovação da Tese ou Dissertação, exemplo: Tese aprovada em: 27 de março de 2008 (na parte média inferior, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhado à esquerda);
- d)** nome, titulação e assinatura de todos os componentes da banca examinadora e instituições a que pertencem (na parte média inferior, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhado à esquerda);
- e)** local (cidade) da instituição (na parte inferior, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhamento centralizado);
- f)** ano da defesa (logo abaixo do item e, sem espaço, fonte “Times New Roman”, tamanho 14, alinhamento centralizado).

Observação: A data de aprovação e assinaturas dos membros componentes da banca examinadora será colocada após a aprovação do trabalho.

1.6 Dedicatória (s)

Elemento opcional, colocado após a folha de aprovação, onde o autor presta homenagem ou dedica seu trabalho. Esta folha não deve conter o título (dedicatória) nem o indicativo numérico.

1.7 Agradecimento (s)

Esta folha deve conter o título (Agradecimento ou Agradecimentos), sem indicativo numérico, centralizado, sendo elemento opcional, colocado após a dedicatória, onde o autor faz agradecimentos dirigidos àqueles que contribuíram de maneira relevante à elaboração do trabalho.

1.8 Epígrafe

Elemento opcional, colocado após os agradecimentos. Folha onde o autor apresenta uma citação, seguida de indicação de autoria, relacionada com a matéria tratada no corpo do

trabalho. Esta folha não deve conter o título (epígrafe) nem o indicativo numérico. Podem também constar epígrafes nas folhas de abertura das seções primárias.

Observação: o conjunto dos itens relacionados à dedicatória (s), agradecimento (s) e epígrafe deve conter no máximo cinco páginas.

1.9 Resumo na língua vernácula

Esta folha deve conter o título (Resumo), sem indicativo numérico, centralizado, conforme a ABNT NBR 6024, sendo elemento obrigatório, escrito em português, em parágrafo único, de forma concisa e objetiva dos pontos relevantes, fornecendo a essência do estudo. O resumo deve conter no máximo 500 palavras, espaço simples entre linhas, seguido, logo abaixo, das palavras representativas do conteúdo do trabalho, isto é, palavras-chave e/ou descritores. Estes descritores devem ser integrantes da lista de "Descritores em Ciências da Saúde", elaborada pela BIREME e disponível nas bibliotecas médicas ou na Internet (<http://decs.bvs.br>). Todas as palavras-chave necessitam serem separadas entre si e finalizadas por ponto.

1.10 Resumo na língua estrangeira - Abstract

Esta folha deve conter o título (Abstract), sem indicativo numérico, centralizado, sendo elemento obrigatório, escrito em inglês, com as mesmas características do resumo na língua vernácula. O resumo deve conter no máximo 500 palavras, espaço simples entre linhas. Deve ser seguido das palavras representativas do conteúdo do trabalho, isto é, palavras-chave e/ou descritores, na língua.

1.11 Lista de ilustrações

Elemento opcional, que deve ser elaborado de acordo com a ordem apresentada no texto, com cada item designado por seu nome específico, acompanhado do respectivo número da página. Quando necessário, recomenda-se a elaboração de lista própria para cada tipo de ilustração (desenhos, esquemas, fluxogramas, fotografias, gráficos, mapas, organogramas, plantas, quadros, retratos e outros). Esta folha deve conter o título (Lista de ilustrações), sem indicativo numérico, centralizado.

1.12 Lista de tabelas

Elemento opcional, elaborado de acordo com a ordem apresentada no texto, com cada item designado por seu nome específico, devidamente numeradas, acompanhado do respectivo número da página. Esta folha deve conter o título (Lista de tabelas), sem indicativo numérico, centralizado.

1.13 Lista de abreviaturas e siglas

Elemento opcional, que consiste na relação alfabética das abreviaturas e siglas utilizadas no texto, seguidas das palavras ou expressões correspondentes grafadas por extenso. Esta folha deve conter o título (Lista de abreviaturas e siglas), sem indicativo numérico, centralizado.

A abreviatura é a redução gráfica de um nome ou de uma seqüência de nomes, resultando em um outro único nome conciso com o mesmo significado.

É necessário que, antes da primeira aparição no texto de uma abreviação ou sigla, se coloque por extenso o nome ou seqüência de nomes que a originou, colocando o nome abreviado entre parênteses. Em seguida, deve-se usar sempre a sigla ou abreviação. Deve-se evitar, todavia, a utilização de siglas ou abreviaturas nos títulos.

1.14 Lista de símbolos

Elemento opcional, que deve ser elaborado de acordo com a ordem apresentada no texto, com o devido significado. Esta folha deve conter o título (Lista de símbolos), sem indicativo numérico, centralizado.

1.15 Sumário

Esta folha deve conter o título (Sumário), sem indicativo numérico, centralizado e os elementos pré-textuais não devem figurar neste item.

O sumário é a enumeração das principais divisões, seções e outras partes do trabalho, na mesma ordem e grafia em que a matéria nele se sucede, deve ser localizado como o último elemento pré-textual, considerado elemento obrigatório, cujas partes são acompanhadas do(s) respectivo(s) número(s) da(s) página(s).

Exemplo:

12 Aspectos Clínicos da Amebíase..... 45

2 Textuais — Modelo de Tese ou Dissertação com Inclusão de Artigos

2.1 Apresentação

Texto preliminar no início do manuscrito que servirá de preparação aos estudos. Deve conter a caracterização e a relevância do problema (argumentos que estabelecem a legitimidade do estudo científico), a hipótese/pergunta condutora da pesquisa (proposição que visa a fornecer uma explicação verossímil para um conjunto de evidências e que deve estar submetida ao controle da experiência), os objetivos da tese ou da dissertação (finalidades que devem ser atingidas), os métodos adequados para testar as hipóteses. Os objetivos devem ser claramente descritos, com frases curtas e concisas, e as informações sobre os artigos, relacionando com os objetivos e referência ao periódico que será/foi submetido.

Observação: neste item, havendo citação de autores no texto seguir as normas vigentes da ABNT NBR 10520 (Informação e documentação - Citações em documentos – Apresentação).

2.2 Revisão da Literatura (estudo quantitativo) / Referencial Teórico (estudo qualitativo)

A revisão da literatura é um levantamento que focaliza os principais tópicos dos temas a serem abordados. Esta revisão deverá dar subsídios para as hipóteses levantadas pelo autor.

O referencial teórico ancora, explica ou compreende o objeto do estudo sendo construído a partir de uma teoria ou por construtos: “idéias e termos categoriais, princípios condutores, opiniões influentes ou conceitos essenciais adotados, em uma teoria ou área de estudo”

(Carvalho, 2003, p.424)². Desta forma esta construção deve articular ao objeto do estudo com alguma teoria ou alguns construtos vindos de uma revisão de literatura.

A revisão da literatura ou o referencial teórico pode ser um capítulo da dissertação ou da tese ou ser um artigo de revisão sobre o tema da tese, submetido ou publicado em revista indexada pelo doutorando ou mestrando, como autor principal. Neste caso, o artigo inserido deve seguir as normas da revista, onde foi publicado ou submetido. Se for o caso, a comprovação da submissão deverá ser incluída no item: anexos.

Neste capítulo deve seguir as normas vigentes da ABNT: referências (Conjunto padronizado de elementos descritivos retirados de um documento, que permite sua identificação individual - **NBR 6023**) **e apresentação de citações** (Menção, no texto, de uma informação extraída de outra fonte - **NBR 10520**). **Em caso do artigo de revisão ser submetido ou publicado, seguir as normas de instruções aos autores da revista.**

2.3 Métodos (estudo quantitativo) / Caminho Metodológico (estudo qualitativo)

Detalhar o necessário para que o leitor possa reproduzir o estudo, criticar e analisar as soluções encontradas pelo mestrando ou doutorando frente aos problemas surgidos na execução do projeto. A análise dos dados deve ser escrita de modo a permitir a avaliação crítica das opções feitas.

Neste item, quando se tratar de estudo qualitativo a expressão “Métodos” pode ser substituída pelas expressões: “Caminho Metodológico”, “Percurso Metodológico”, entre outras.

² CARVALHO, Vilma de. Sobre construtos epistemológicos nas ciências: uma contribuição para a enfermagem. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 4, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-11692003000400003&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 18 Mar 2008.

2.4 Resultados — Artigos Originais

Neste capítulo deverão ser colocados os artigos originais resultantes do trabalho de Tese ou de Dissertação, tendo como autor principal o aluno da Pós-Graduação. Estes trabalhos deverão ser submetidos ou publicados em revistas científicas indexadas (formatados de acordo com as normas do periódico que foi/será submetido pelo doutorando ou mestrando como autor principal). No caso do doutorando, a comprovação da submissão dos artigos deverá ser incluída no item: anexos.

2.5 Considerações Finais

Neste capítulo devem-se expor as conseqüências das observações realizadas. É o momento de emitir eventuais generalizações. Não deve ser repetições dos resultados, mas sim uma boa síntese deles. Constitui-se de respostas às indagações feitas, isto é, às enunciadas na introdução e detalhadas nos objetivos. O autor deverá se posicionar frente ao problema estudado e poderá incluir recomendações, inclusive discutir novas hipóteses e conseqüentemente novos estudos e experimentos.

3 Pós-textuais

3.1 Referências

Conjunto padronizado de elementos descritivos, retirados de um documento, que permite sua identificação individual. Esta folha, elemento obrigatório, deve conter o título (Referências), sem indicativo numérico, centralizado. As referências são alinhadas à esquerda, devendo seguir as normas da ABNT NBR 6023, exceto as dos capítulos que foram enviados para publicação.

Neste item são citadas **apenas** as referências da introdução, dos métodos/procedimento metodológico e da revisão bibliográfica (quando não for um artigo que será submetido a uma Revista indexada). As referências dos artigos estão contempladas nos próprios artigos, conforme as normas de “instruções aos autores”.

3.2 Apêndice

Textos ou documentos elaborados pelo autor da dissertação/tese com a finalidade de complementar sua argumentação, sem prejuízo da unidade nuclear do trabalho. Esta folha, elemento opcional, deve conter o título (**Apêndice**), sem indicativo numérico, centralizado.

O (s) apêndice (s) é identificado por letras maiúsculas consecutivas, travessão e pelos respectivos títulos. Excepcionalmente utilizam-se letras maiúsculas dobradas, na identificação dos apêndices, quando esgotadas as 23 letras do alfabeto.

Exemplo:

APÊNDICE A – Avaliação numérica de células inflamatórias totais aos quatro dias de evolução

APÊNDICE B – Avaliação de células musculares presentes nas caudas em regeneração

3.3 Anexos

Texto ou documento não elaborado pelo autor e que serve de fundamentação, comprovação ou ilustração. Esta folha, elemento opcional, deve conter o título (**Anexo**), sem indicativo numérico, centralizado.

O (s) anexo (s) é identificado por letras maiúsculas consecutivas, travessão e pelos respectivos títulos. Excepcionalmente utilizam-se letras maiúsculas dobradas, na identificação dos anexos, quando esgotadas as 23 letras do alfabeto.

Exemplo:

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO B – Documentação de encaminhamento do artigo ao periódico

III REGRAS GERAIS DE FORMATAÇÃO

4 Formato

Os textos devem ser apresentados em papel branco, formato A4 (21 cm x 29,7 cm), digitados na frente das folhas, com exceção da folha de rosto cujo verso deve conter a ficha catalográfica, impressos em cor preta, podendo utilizar outras cores somente para as ilustrações.

O projeto gráfico é de responsabilidade do autor do trabalho.

Recomenda-se, para digitação, o texto na cor preta, sendo que as gravuras podem ser cores livres. A fonte Times New Roman, tamanho 12 para todo o texto, excetuando-se as citações de mais de três linhas, notas de rodapé, paginação e legendas das ilustrações e das tabelas que devem ser digitadas em tamanho menor e uniforme.

No caso de citações de outros autores, com mais de três linhas, um recuo de 4 cm da margem esquerda do texto deve ser observado.

O alinhamento para o texto é justificado.

5 Margem

As folhas devem apresentar margem esquerda e superior de 3 cm; direita e inferior de 2 cm.

6 Espacejamento

Todo o texto deve ser digitado ou datilografado com espaço 1,5, excetuando-se as citações de mais de três linhas, notas de rodapé, referências, legendas das ilustrações e das tabelas, ficha catalográfica, natureza do trabalho, objetivo, nome da instituição a que é submetida e área de concentração, que devem ser digitados ou datilografados em espaço simples. As referências, ao final do trabalho, devem ser separadas entre si por dois espaços simples.

Os títulos das seções devem começar na parte superior da mancha e serem separados do texto que os sucede por dois espaços 1,5, entrelinhas. Da mesma forma, os títulos das subseções devem ser separados do texto que os precede e que os sucede por dois espaços 1,5.

Na folha de rosto e na folha de aprovação, a natureza do trabalho, o objetivo, o nome da instituição a que é submetido e a área de concentração devem ser alinhados do meio da mancha para a margem direita.

7 Notas de rodapé

As notas devem ser digitadas ou datilografadas dentro das margens, ficando separadas do texto por um espaço simples de entrelinhas e por filete de 3 cm, a partir da margem esquerda.

8 Indicativos de seção

O indicativo numérico de uma seção precede seu título, alinhado à esquerda, separado por um espaço de caractere.

9 Paginação

Todas as folhas do trabalho, a partir da folha de rosto, devem ser contadas sequencialmente, mas não numeradas.

A numeração é colocada, a partir da primeira folha da parte textual, em algarismos arábicos, no canto superior direito da folha, a 2 cm da borda superior, ficando o último algarismo a 2 cm da borda direita da folha. Havendo apêndice e anexo, as suas folhas devem ser numeradas de maneira contínua e sua paginação deve dar seguimento à do texto principal.

10 Numeração progressiva

Para evidenciar a sistematização do conteúdo do trabalho, deve-se adotar a numeração progressiva para as seções do texto. Os títulos das seções primárias, por serem as principais

divisões de um texto, devem iniciar em folha distinta. Destacam-se gradativamente os títulos das seções, utilizando-se os recursos de negrito, itálico ou grifo e redondo, caixa alta ou versal, e outro, no sumário e de forma idêntica, no texto.

Recife, 05 de junho de 2008.

**Coordenação da Comissão dos Coordenadores dos Programas de Pós-Graduação do Centro
de Ciências da Saúde (CCS) / UFPE**



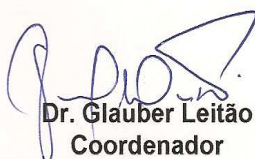
DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto de Pesquisa nº 30/2009 intitulado: **“LESÕES HPV INDUZIDAS EM MUCOSAS ANOGENITAL EM PACIENTES HIV-NEGATIVOS”**, apresentado pela pesquisadora **Maria das Graças de Fatima Cavalcante Castor**, foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer / Hospital de Câncer de Pernambuco.

Os autores deverão remeter cópia do artigo publicado para arquivo na Biblioteca da SPCC / HCP e terão que mencionar nas publicações a Instituição onde o trabalho foi realizado.

Recife, 11 de agosto de 2009.

Atenciosamente,



Dr. Glauber Leitão
Coordenador

Comissão de Ética em Pesquisa
Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer
Hospital de Câncer de Pernambuco