

MARIA CECÍLIA DE SANT'ANNA SOARES BORGES CAIXETA

EPIDEMIOLOGIA DOS TIPOS DE HPV EM EXAMES DE GENOTIPAGEM,
CITOLOGIAS CERVICAIS E BIÓPSIAS PENIANAS: ANÁLISE DE BANCO DE
DADOS DE UM LABORATÓRIO CLÍNICO DO DISTRITO FEDERAL.

BRASÍLIA, 2012

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARIA CECÍLIA DE SANT'ANNA SOARES BORGES CAIXETA

EPIDEMIOLOGIA DOS TIPOS DE HPV EM EXAMES DE GENOTIPAGEM,
CITOLOGIAS CERVICAIS E BIÓPSIAS PENIANAS: ANÁLISE DE BANCO DE
DADOS DE UM LABORATÓRIO CLÍNICO DO DISTRITO FEDERAL.

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Orientador: Gustavo Barcelos Barra

BRASÍLIA
2012

MARIA CECÍLIA DE SANT'ANNA SOARES BORGES CAIXETA

EPIDEMIOLOGIA DOS TIPOS DE HPV EM EXAMES DE GENOTIPAGEM,
CITOLOGIAS CERVICAIS E BIÓPSIAS PENIANAS: ANÁLISE DE BANCO DE
DADOS DE UM LABORATÓRIO CLÍNICO DO DISTRITO FEDERAL.

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília

Aprovado em 29 de fevereiro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Gustavo Barcelos Barra (presidente)
Universidade de Brasília – UnB

José Eduardo Levi
Universidade de São Paulo – USP

Monalisa Ferreira Azevedo
Universidade de Brasília – UnB

Angélica Amorim Amato (suplente)
Universidade de Brasília - UnB

*Dedico esse trabalho aos meus pais,
Ronaldo e Silma.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado força, fé e saúde.

Aos meus pais, Ronaldo e Silma, pelo apoio, força, orações, incentivo e oportunidades. Sem eles não teria chegado até aqui.

Ao Gustavo Barra, “Gus”, orientador e amigo; pelas idéias, confiança, dedicação e assistência.

Ao Laboratório Sabin, o investidor e dono de todo o tesouro (banco de dados) que possibilitou a realização desse trabalho, pela oportunidade e investimento.

Aos colegas e amigos de trabalho, Dra. Lara Velasco, Patrícia Godoy, Cláudia Souza e Vanessa Marques, pela força, paciência, compreensão, flexibilidade e apoio.

À minha Tia Sandra, por todas as oportunidades, orações e apoio.

À Mônica Franco e Ticiane Santa Rita, parceiras nesse trabalho.

Às amigas que fiz nessa trajetória, Juliane e Amanda, e à Ana Cláudia, pela amizade e força.

RESUMO

Infecção genital por Papilomavírus Humano (HPV) é a mais comum dentre as doenças sexualmente transmissíveis. Nas mulheres é a causa principal de câncer cervical e suas lesões precursoras; nos homens, além das verrugas genitais também contribui para o câncer peniano. Cerca de 100 tipos diferentes de HPV já foram descritos e aproximadamente 15 possuem maior potencial oncogênico. No Brasil, o câncer cervical é o segundo tipo de neoplasia mais comum entre as mulheres, com cerca de 19 mil novos casos anualmente e o câncer pênis representa 2% de todos os tipos de tumores que afetam os homens. Os homens desempenham um papel importante na transmissão do HPV, pois o DNA viral foi detectado na genitália masculina em até 73% dos homens saudáveis. Atualmente, poucos trabalhos se dedicaram a estudar a distribuição e prevalência dos tipos de HPV em homens e mulheres no Distrito Federal. Embora o HPV 16 seja o tipo mais encontrado em mulheres saudáveis e pacientes com câncer cervical, outros tipos virais exibem uma distribuição heterogênea. Além disso, associado à citologia, o teste molecular para detecção e identificação do DNA do HPV vem sendo aprovado para rastreamento primário. Através da análise de banco de dados de um grande laboratório clínico da região centro-oeste do Brasil, procurou-se identificar a distribuição genotípica do HPV em amostras de homens e mulheres e correlacioná-la à idade e tipos de lesões diagnosticadas em exames de citologia cervical e biópsia peniana. Foram identificadas 4251 amostras que realizaram o exame de genotipagem para HPV pela metodologia do Papillocheck®, no período de fevereiro de 2009 a maio de 2011. A partir dessas amostras foi possível demonstrar uma positividade de 44,4%, sendo que os homens tinham proporcionalmente mais resultados positivos que as mulheres (56,8% *versus* 44,3%, $p < 0,0001$). No entanto, as mulheres apresentam mais genótipos de alto risco que os homens (77,02% *versus* 57,9%, $p < 0,0001$). As mulheres apresentam também mais infecções simples que os homens (56,4% *versus* 45%, $p < 0,0001$), e estas infecções simples aumentam com a idade [$P_{(trend)} < 0,0001$]. Em ordem decrescente, os três genótipos mais freqüentes nas mulheres foram HPV 16, 56 e 53; e nos homens HPV 6, 42 e 43. A positividade diminui com o aumento da idade em ambos os sexos [$P_{(trend)} < 0,0001$]. Dentre as mulheres que realizaram o exame de genotipagem, 1913 fizeram também a citologia cervical, dentre estas, a positividade para HPV aumenta com a gravidade da lesão observada no exame citológico, 34,05%, 66,41%, 92,73% e 100% para PN, ASCUS, LSIL e HSIL, respectivamente [$P_{(trend)} < 0,0001$]. A proporção de genótipos de alto risco também aumenta com a gravidade da lesão, PN (71,94%), ASCUS (79,67%), LSIL (79,38%), HSIL (85%) [$P_{(trend)} = 0,0087$]. Analisou-se por fim, homens que realizaram genotipagem para HPV e biópsia de lesões penianas, 72,1% foram positivos para HPV. As alterações citopáticas relacionadas à presença do DNA do HPV foram hiperqueratose ($p = 0,003$), acantose irregular ($p = 0,003$) e papilomatose ($p = 0,037$); a atipia colocítica apresentou associação próxima a significância ($p = 0,099$). Interessantemente, Paraceratose ($p = 0,046$), atipia colocitótica ($p < 0,001$) e hiperplasia e perda da polaridade basal ($p = 0,024$) estavam associadas as infecção multiplas. Entretanto, não foi observada associação entre as alterações citopáticas com o risco genótipo-específico. Por fim, este trabalho demonstra que muito conhecimento está escondido no banco de dados de laboratórios clínicos e a mineração de dados, pode ser uma ferramenta importante para que este conhecimento seja revelado. Assim, ao avaliar o banco de dados de resultados um laboratório clínico pode-se contribuir para o desenvolvimento médico e científico.

Palavras-chaves: HPV; genotipagem HPV; banco de dados.

ABSTRACT

Genital infection by human papillomavirus (HPV) is the most common of sexually transmitted diseases. In women, it is the main cause of cervical cancer and its precursor lesions, in men, it is the main cause of genital warts, also contributes to penile cancer. Approximately 100 different HPV types have been described and about 15 are oncogenic. In Brazil, cervical cancer is the second most common type of cancer among women, with about 19,000 new cases annually, and penile cancer represents 2% of all tumor types that affect men. Men play an important role in the transmission of HPV, viral DNA was detected on the male genitalia in up to 73% of healthy males. Currently, little is known about the distribution and prevalence of HPV types in men and women in Brazil Federal District. Although HPV 16 is the most commonly type found in healthy women and patients with cervical cancer, other viral genotypes exhibit a heterogeneous distribution. Associated with cytology, the molecular test for detection and identification of HPV DNA has been approved for primary screening. By analyzing the database of a large clinical laboratory in the central-western Brazil, we sought to identify the HPV genotype distribution in samples of men and women and correlate it to age and injuries diagnosed in cytology cervical and penile biopsy. 4251 samples were examined for HPV genotyping methodology Papillocheck® for the period February 2009 to May 2011. These samples demonstrated a positivity of 44.4%, and that men had proportionately more positive results than women (56.8% versus 44.3%, $p < 0.0001$). However, women have more high-risk genotypes than men (77.02% versus 57.9%, $p < 0.0001$). Women are also more simple infections than men (56.4% versus 45%, $p < 0.0001$), and simple infections increase with age [P (trend) < 0.0001]. In descending order, the three most common genotypes in women were HPV 16, 56 and 53, and in men HPV 6, 42 and 43. The positivity decreases with increasing age in both sexes [P (trend) < 0.0001]. Among women who underwent the genotyping, 1913 have also cervical cytology, among these, positivity for HPV increases with the severity of the lesion on cytology, 34.05%, 66.41%, 92.73% and 100% for PN, ASCUS, LSIL and HSIL, respectively [P (trend) < 0.0001]. The proportion of high-risk genotypes also increases with the severity of a PN (71.94%), ASCUS (79.67%), LSIL (79.38%), HSIL (85%) [P (trend) = 0.0087]. 72.1% men who underwent genotyping for HPV and penile lesion biopsy were positive for HPV. The cytopathic changes related to the presence of HPV DNA were hyperkeratosis ($p = 0.003$), irregular acanthosis ($p = 0.003$) and papillomatosis ($p = 0.037$), atypia was associated coilocítica close to significance ($p = 0.099$). Interestingly, parakeratosis ($p = 0.046$), koilocytotic atypia ($p < 0.001$) and hyperplasia and loss of polarity baseline ($p = 0.024$) were associated with the multiple infections. However, no association was observed between the cytopathic changes with the risk specific genotype. Finally, this work demonstrates that much knowledge is hidden in the database of clinical laboratory and data mining, can be an important tool to reveal this knowledge.

Keywords: HPV; HPV genotyping; database.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	O PAPILOMAVÍRUS HUMANO – PARTÍCULA VIRAL E ORGANIZAÇÃO DO GENOMA	15
1.1.1	Taxonomia, nomenclatura e classificação	18
1.2	DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA DO HPV	23
1.3	HPV E CÂNCER CERVICAL	26
1.4	HPV E CÂNCER PENIANO	28
1.5	CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES ASSOCIADAS AO PAPILOMAVÍRUS HUMANO – CITOPATOLÓGICAS E HISTOPATOLÓGICAS	30
1.6	DIAGNÓSTICO CITOPATOLÓGICO	35
1.6.1	Lesões Inflamatórias	38
1.6.2	Lesões Escamosas Intraepiteliais	39
1.7	DIAGNÓSTICO MOLECULAR	45
1.7.1	Microarranjos	47
2	OBJETIVOS	50
2.1	OBJETIVO GERAL	50
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
3	MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1	ANÁLISE NO BANCO DE DADOS DE RESULTADOS LABORATORIAIS	51
3.2	POPULAÇÃO ESTUDADA	52
3.3	VARIÁVEIS CATEGÓRICAS AVALIADAS	53
3.4	DIVISÕES DO ESTUDO	54
3.4.1	Parte 1	54
3.4.2	Parte 2	55
3.4.3	Parte 3	56
3.5	EXAME DE GENOTIPAGEM DE HPV NO LABORATÓRIO SABIN DE ANÁLISES CLÍNICAS	56
3.6	EXAME CITOLÓGICO CÉRVICO-VAGINAL (COLPOCITOLOGIA)	57
3.7	EXAME DE BIÓPSIA PENIANA	58
3.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	58
4	RESULTADOS	60
4.1	PARTE 1	60
4.1.1	Análise total do banco de dados	60
4.2	PARTE 2	70
4.2.1	Análise no banco de dados de amostras que realizaram genotipagem de HPV e citologia de raspado cervical	70
4.3	PARTE 3	82
4.3.1	Análise no banco de dados de amostras que realizaram genotipagem de HPV e biópsia de lesão peniana	82
5	DISCUSSÃO	89
5.1	POSITIVIDADE	90
5.2	TIPO DE INFECÇÃO	94

5.3	ONCOGENICIDADE VIRAL	97
5.4	DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA DO HPV	98
5.5	ESPÉCIES DE HPV	103
5.6	INFLUÊNCIA DA IDADE SOBRE OS PARÂMETROS DA INFECÇÃO PELO HPV.	104
6	CONCLUSÕES	107
6.1	PARTE 1.....	107
6.2	PARTE 2.....	108
6.3	PARTE 3.....	109
7	ANEXOS	110
7.1	RESUMOS ENVIADOS PARA CONGRESSOS EM 2011 E 2012 COM RESULTADOS DESTES TRABALHOS.....	110
7.2	DISTRIBUTION OF GENOTYPES/SPECIES OF HPV IN PENILE LESIONS BIOPSIES.....	110
7.3	CHANGES IN HPV INFECTION PATTERN WITH ADVANCING OF AGE IN MEN AND WOMEN.....	111
7.4	HPV INFECTION PATTERN AND GENOTYPE DISTRIBUTION IN CERVICAL CYTOLOGY AND IN PENILE LESION BIOPSIES.....	112
7.5	HPV GENOTYPE DISTRIBUTION IN BOTH SIMPLE AND MULTIPLE INFECTIONS AND CHANGES INFECTION PATTERN WITH ADVANCING OF AGE IN MEN AND WOMEN.....	113
7.6	HPV GENOTYPE/SPECIES DISTRIBUTION IN BOTH SIMPLE AND MULTIPLE INFECTIONS AMONG MEN AND WOMEN (TRABALHO PREMIADO COMO UM DOS MELHORES RESUMOS ENVIADOS NO CONGRESSO DA AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY EM 2011).	115
7.7	ARTIGOS CIENTÍFICOS PRODUZIDOS PELA ALUNA DURANTE O PERÍODO DE MESTRADO (EM PUBLICAÇÃO).....	116
7.8	APROVAÇÕES EM COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	116
8	REFERÊNCIAS.....	120

1 INTRODUÇÃO

Papilomavírus Humano (HPV) é a infecção sexualmente transmissível mais comum em homens e mulheres (1-3). HPV é causa comprovada de câncer cervical e suas lesões precursoras nas mulheres (2-4). Nos homens, a infecção por esse vírus contribui para doenças como verrugas genitais, e diversos cânceres, incluindo câncer de ânus e de pênis (3). Cerca de 100 tipos diferentes de HPV, com variações distintas em seu potencial genético e oncogênico são conhecidos (5). Eles foram caracterizados e ordenados filogeneticamente de acordo com suas similaridades na sequência genômica e aproximadamente 40 deles podem infectar o trato genital (6, 7). Foram ainda classificados em alto e baixo risco oncogênico, aproximadamente 15 tipos possuem maior potencial oncogênico e são os chamados HPV de alto risco (8-11).

O câncer cervical é a neoplasia ginecológica mais comum e umas das principais causas de morte por câncer em mulheres no mundo (4); na América Latina conta com 15% das incidências de casos e mortes (2). No Brasil, o câncer cervical é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres, com aproximadamente 19 mil novos casos anualmente (12, 13). Além disso, cerca de 70% dos casos de cânceres cervicais no mundo são atribuídos a apenas dois tipos, HPV 16 e 18 (10, 11). Acredita-se que o tipo de HPV afeta tanto o risco absoluto de persistência viral e de progressão a pré-câncer dada uma persistência viral (14).

O exame colpocitopatológico, teste de Papanicolaou, colpocitologia oncológica ou oncótica é o método de rastreamento do câncer cervical presente no cenário nacional desde a década de 50. Trata-se de um método simples, barato e eficiente para detecção de lesões precursoras de neoplasias, ou dessas fases iniciais, e está à disposição da população feminina em toda a rede básica de saúde. No entanto, as ações para prevenção e detecção precoce do câncer do colo do útero, configuram-se em ações isoladas, longe de comporem um Programa de Rastreamento. Para alcançar resultados efetivos, é necessário se atentar para aspectos como: definição da população alvo, qualidade da coleta de Papanicolaou, periodicidade do exame, qualidade do diagnóstico, condutas padronizadas para o tratamento dos casos alterados e seguimento das mulheres com câncer, identificando parâmetros de avaliação para cada uma das variáveis (15).

Associado à citologia, o teste molecular para detecção do DNA do HPV vem sendo aprovado para rastreamento primário em mulheres de 30 anos ou mais (16).

O conselho de saúde holandês foi o primeiro a propor a incorporação do teste de diagnóstico do HPV como método de screening primário em seu programa de rastreio do câncer do colo do útero (17). Trata-se de um teste mais sensível, com valor preditivo negativo alto, proporcionando a garantia de que os testes negativos possuem baixo risco de desenvolver câncer ou lesões precursoras, mas são menos específicos que a citologia, já que as infecções por HPV são muito comuns (16). Desta forma, a genotipagem do vírus em vez de sua mera detecção tem sido recomendada, pois ela tem o potencial clínico para melhorar o rastreio do câncer cervical identificando mulheres com risco muito elevado para câncer entre as pessoas em risco (18). Infelizmente, no Brasil, esse tipo de conduta está longe da realidade, devido ao alto custo da técnica e a falta de programas organizados de rastreamento (19). O câncer de pênis é muito mais comum em países africanos, asiáticos e sul americanos. Constituindo cerca de 10% das neoplasias desses continentes e, portanto, representa um problema de saúde considerável (20). No Brasil, esse tipo de tumor representa 2% de todos os tipos de câncer que atingem o homem (21). Revisão da literatura revelou que cerca de 45% a 80% dos casos desse tipo de câncer estão relacionados ao HPV (20). A taxa de infecção genital por HPV entre homens é semelhante à de mulheres. No período de um ano, a probabilidade de um homem sexualmente ativo adquirir uma nova infecção genital por HPV é de 0,29 a 0,39, o que é uma estimativa semelhante para as mulheres (22). Os homens desempenham um papel importante na transmissão do HPV, o ácido desoxirribonucleico (DNA) viral foi detectado na genitália masculina em até 73% dos homens saudáveis (23). Os genótipos de HPV 16 e 18 também possuem uma forte correlação com câncer de pênis, em 25 a 94,7% dos casos foram detectados HPV 16 e em 10 a 55% HPV 18 (20).

A forma subclínica constitui a mais freqüente apresentação do HPV no homem e o aumento de sua incidência se deve a fatores como hábitos do hospedeiro, interação agente-hospedeiro, métodos terapêutico/preventivos precários e aperfeiçoamento dos métodos diagnósticos, como a colposcopia na área da ginecologia e a peniscopia na área da urologia (24). Relativamente pouco se sabe sobre a epidemiologia da infecção peniana pelo HPV, em parte devido à falta de técnicas de amostragem de células penianas para detecção de DNA do HPV. Várias técnicas já foram publicadas e têm sido usadas para definir melhor prevalência, incidência e *clearance* da infecção peniana por HPV (25).

O genótipo de HPV é um importante fator de risco para a progressão diferencial do câncer cervical (2). Atualmente, pouco se sabe sobre a distribuição e prevalência dos tipos de HPV no Distrito Federal (DF). Embora o HPV 16 seja o tipo mais comumente encontrado em mulheres saudáveis e pacientes com câncer cervical, outros genótipos virais exibem uma distribuição heterogênea (26). Vários tipos de HPV são frequentemente encontrados na genitália externa dos homens, (3); entretanto pouco se sabe sobre a distribuição genotípica nestas amostras, mesmo sabendo que a infecção por HPV nos homens contribui de forma significativa para a infecção subsequente nas mulheres através da transmissão entre parceiros (27).

Atualmente existem duas vacinas preventivas que tem como alvos os HPV 16 e 18, Cevarix® e Gardasil®, a segunda também previne contra dois tipos de baixo risco HPV 6 e 11, que juntos são responsáveis por 90% das verrugas genitais. No entanto, elas oferecem proteção apenas contra alguns tipos de HPV que causam câncer (23); dados de vários países demonstram a presença, em níveis significantes, de tipos de HPV que não estão incluídos na preparação das vacinas atualmente disponíveis, indicando que estas vacinas poderiam ser menos eficazes em uma determinada área do mundo (28). Devido ao fato de a prevalência de tipos de HPV diferir por região, é importante que pesquisadores conduzam uma série de estudos para estabelecer padrões globais e regionais de distribuição genotípica desse vírus e de doenças clinicamente relacionadas (13). Nesse sentido, testes de genotipagem do HPV foram introduzidos na prática clínica com a finalidade de melhorar a eficiência e maximizar o rastreio do câncer cervical (18), além disso, permite avaliar a persistência da infecção pelo mesmo genótipo (18, 29, 30). Assim como, identificar co-infecções, as quais têm sido associadas a um risco aumentado de desenvolver câncer cervical (9).

Entretanto, o exame de genotipagem ainda é de alto custo o que inviabiliza sua execução em grandes amostras. O preço de custo do exame de genotipagem baseado na técnica de *microarray* de DNA, como o PapilloCheck®, utilizado neste estudo é de R\$100,00 (31). Assim, neste trabalho, analisamos o banco de dados de resultados de genotipagem de HPV de um grande laboratório clínico da região centro-oeste do Brasil. O banco de dados de um laboratório clínico abriga um verdadeiro tesouro, a mineração desses dados pode ser uma ferramenta importante para transformar essa riqueza em conhecimento. Ao permitir a análise de seus dados armazenados, o laboratório clínico está contribuindo para o desenvolvimento

médico e científico de forma econômica, tanto de tempo como de recursos financeiros (32); pois, o custo e a execução das análises clínicas são mitigados pelo trabalho da rotina laboratorial (33). Além disso, o conhecimento científico originado da análise de banco de dados de clínicas, hospitais, e de dados secundários de outros estudos clínicos tem gerado importantes conclusões acerca de diversas enfermidades (32).

Desta forma, com este estudo pretendemos revelar parâmetros relacionados à infecção pelo HPV como positividade, o tipo de infecção (simples ou múltipla), a oncogenicidade do vírus, distribuição genotípica, e das espécies do HPV em homens e mulheres, e sua associação com exames de citologia cervical e biópsia de lesões penianas a fim de se obter um perfil dessa infecção no DF. Assim, foi possível fazer correlações da frequência genotípica entre tipos de infecções, sexo, idade e lesões cervicais e penianas. Portanto, este estudo foi organizado em três partes. Na parte 1, a totalidade dos resultados do banco de dados de genotipagem de HPV foi analisada, mais de 4000 amostras foram incluídas e então, avaliou-se a positividade, o tipo de infecção, a oncogenicidade do vírus, a distribuição dos genótipos e das espécies de HPV na totalidade das amostras, nos homens e nas mulheres. Além disso, dividiram-se os gêneros em três faixas etárias, menor ou igual a 30 anos, entre 31 e 44 anos, e maior ou igual a 45 anos, e foram realizadas as mesmas análises em busca de tendências de aumento ou diminuição dos parâmetros de infecção supracitados. Na parte 2 do estudo foram incluídas amostras de mulheres que realizaram a genotipagem de HPV e citologia cervical com a intenção de identificar a positividade, o tipo de infecção, a oncogenicidade do vírus, a distribuição dos genótipos e das espécies de HPV nos possíveis resultados da citologia cervical segundo o sistema de classificação Bethesda. Este sistema classifica os achados citológicos em Padrão Normal ou dentro dos limites da normalidade (PN); Atipias em Células Escamosas de Significado Indeterminado (ASCUS); Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL); e Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (LSIL). Na parte 3 do estudo foram incluídas amostras de homens que realizaram a genotipagem de HPV e biópsia de lesão genital com a intenção de identificar a positividade, o tipo de infecção, a oncogenicidade do vírus, a distribuição dos genótipos e das espécies de HPV neste tipo de amostra. Além disso, correlacionar os diferentes tipos de alterações citopáticas como lesão exofítica, hiperkeratose, parakeratose, acantose irregular, papilomatose,

hipergranulose, atipia coilocitótica, queratinização, hiperplasia e perda da polaridade basal com parâmetros da infecção citados anteriormente.

1.1 O PAPILOMAVÍRUS HUMANO – PARTÍCULA VIRAL E ORGANIZAÇÃO DO GENOMA.

Os papilomavírus (PVs) são um grupo heterogêneo de vírus de DNA encontrados em diversas espécies de mamíferos e outros animais. Devido à grande importância médica, o HPV é o grupo mais intensamente estudado (6). Os PVs são pequenos vírus não envelopados, constituídos por uma molécula de DNA circular dupla-fita associada às histonas, formando um complexo semelhante à cromatina. A molécula de DNA se abriga em um invólucro denominado capsídeo, que é composto por 72 subunidades proteicas – os capsômeros. O capsídeo viral apresenta simetria icosaédrica com diâmetro de aproximadamente 55 nanômetros (**Figura 1**) (29, 34-36).

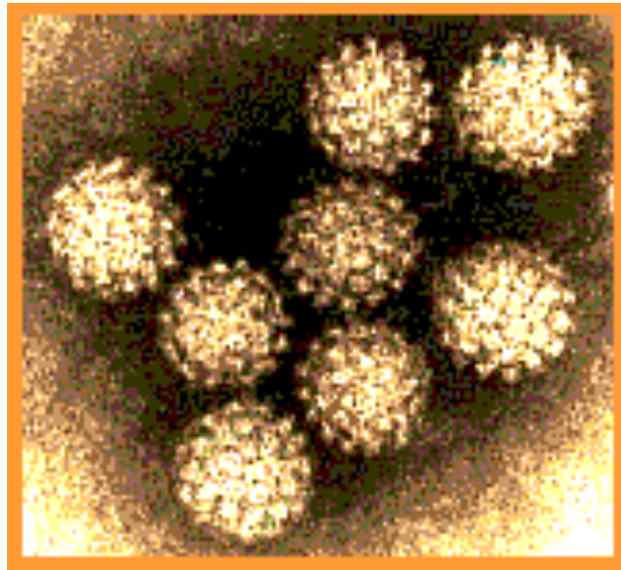


Figura 1: Microscopia eletrônica do HPV (37).

O genoma do HPV é de aproximadamente 8.000 pares de base de comprimento, possui oito fases abertas de leitura (Open Reading Frame – ORF) que estão localizadas em uma mesma fita do DNA. A ORF pode ser dividida em três partes funcionais: a região precoce (E – early) que codifica proteínas, E1 a E7, envolvidas na indução e na regulação da síntese de DNA; a região tardia (L – late) a qual codifica proteínas estruturais do capsídeo (L1 e L2); e a região longa de

controle (Long Control Region – LCR) que não codifica proteína, mas mantém o controle da transcrição do vírus, importante no controle da replicação viral e na transcrição de genes virais e celulares (**Figura 2**) (29, 34-36).

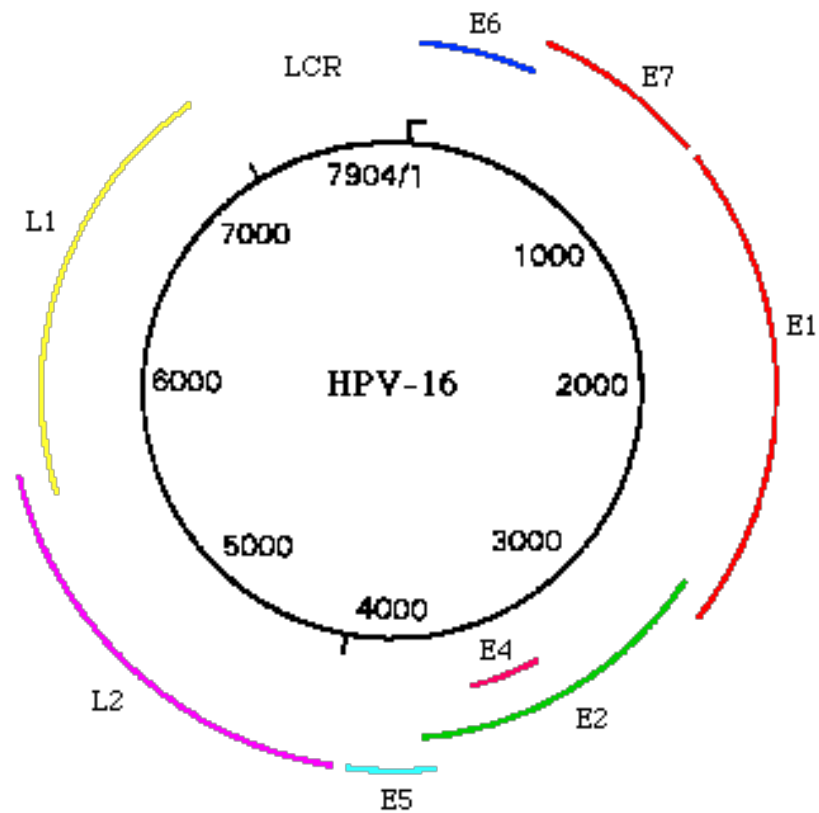


Figura 2: Representação esquemática do genoma do HPV 16
(<http://www.citocamp.com.br/hpv/hpv.html>).

A região precoce E, expressa logo após a infecção, está representada pelos genes E1, associado à replicação viral; E2, associado à transcrição e à replicação; E4, associado à maturação viral e à alteração da matriz intracelular; E5, E6 e E7, envolvidos na transformação celular. A região tardia L, expressa em estágios posteriores da infecção, é formada pelos genes L1 e L2. A proteína L1 é expressa após a L2 no ciclo de replicação viral e medeia a montagem dos vírions (partículas virais completas) de HPV; já a proteína L2 interage com a E2, facilita o transporte de L1 para o núcleo e tem papel no encapsulamento do DNA viral (**Tabela 1**) (34).

Tabela 1 – Descrição das funções dos genes do HPV.

Gene	Função
E1	Atividade de DNA helicase, ligação de ATP (Adenosina Trifosfato) DNA dependente, atividade de ATPase (Adenosina Trifosfatase). Papel na replicação e na repressão da replicação.
E2	Regulador da transcrição e replicação viral, controle da região de expressão precoce (Early), necessária para replicação viral eficiente junto com E1.
E4	Expresso primariamente em epitélio em diferenciação, associado ao citoesqueleto de queratina de células epiteliais em cultura. Papel na liberação do vírus.
E5	Atividade de transformação em HPV16 <i>in vitro</i> . Possivelmente estimula o início da proliferação celular <i>in vivo</i> , mas pode ter um papel na iniciação da carcinogênese. Possivelmente ativa receptores de fatores de crescimento e outras proteínas quinases; inibe apoptose.
E6	Papel no processo de transformação junto com E7. Propriedades de ativação transcricional. E6 dos HPV de alto risco inativa p53 através de degradação rápida através da via da ubiquitina. Junto com E7 propicia um ambiente celular para a replicação viral.
E7	Induz síntese de DNA em células em repouso. E7 se liga à forma hipofosforilada da proteína do retinoblastoma (pRb), resultando em sua inativação funcional permitindo progressão funcional para a fase S do ciclo celular. Proteína E7 dos tipos de baixo risco HPV 6 e 11 se liga menos eficientemente do que a proteína E7 dos tipos de alto risco HPV 16 e 18.
L1	Proteína maior do capsídeo; montagem de capsômeros e capsídeo; interage com L2; interage com receptor(es) celular(es); codifica epitopos neutralizantes.
L2	Proteína menor do capsídeo; interage com DNA; acredita-se que facilita a montagem do vírion.

Fonte: (35, 38)

1.1.1 Taxonomia, nomenclatura e classificação.

Os Papilomavírus Humano pertencem à família *Papillomaviridae* e aos gêneros *Alphapapillomavirus*, que infectam preferencialmente a mucosa oral ou anogenital; *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Nupapillomavirus* e *Mupapillomavirus*, os quais normalmente infectam a pele (39, 40).

Os HPVs são tradicionalmente descritos como “tipos”, centenas de tipos de HPVs já foram classificados com base no isolamento do genoma completo e aproximadamente metade deles infecta o trato genital. A classificação dos HPVs baseia-se na diversidade genômica da sequência completa da ORF do gene L1, que é muito conservado entre os diferentes tipos virais. Um tipo de HPV difere do outro quando apresenta ao menos 10% de divergência na sequência da ORF do gene L1. A classificação em subtipo ocorre quando uma sequência da ORF do gene L1 diverge entre 2% a 10% daquela do tipo mais próximo. Os variantes de tipos de HPV diferem em menos de 2% na sequência de nucleotídeos, e em até 5% na LCR (6, 35). Comparação de sequências entre os genomas completos de 118 tipos de papilomavírus revelam uma grande diversidade entre os vírus, mas uma distribuição semelhante é encontrada quando se comparam as sequências da ORF de L1. Um cladograma baseado na sequência completa de L1 de 96 tipos de HPV e 22 tipos de papilomavírus animais está representado na **Figura 3** (6).

Os gêneros apresentam entre si uma diferença maior que 40% na sequência da ORF de L1, enquanto as espécies diferenciam-se entre 30% e 40%. Gêneros específicos unem espécies, que estão claramente relacionadas filogeneticamente, mas muitas vezes biologicamente bastante diversificadas (6). A classificação em espécies é baseada na relação filogenética próxima entre certos tipos que possuem propriedades biológicas e patológicas em comum, por exemplo, todos os tipos de HPVs que formam uma espécie com o HPV 16 são tipos de alto risco os quais são encontrados em câncer cervical e suas lesões precursoras (**Tabela 2**) (6, 35).

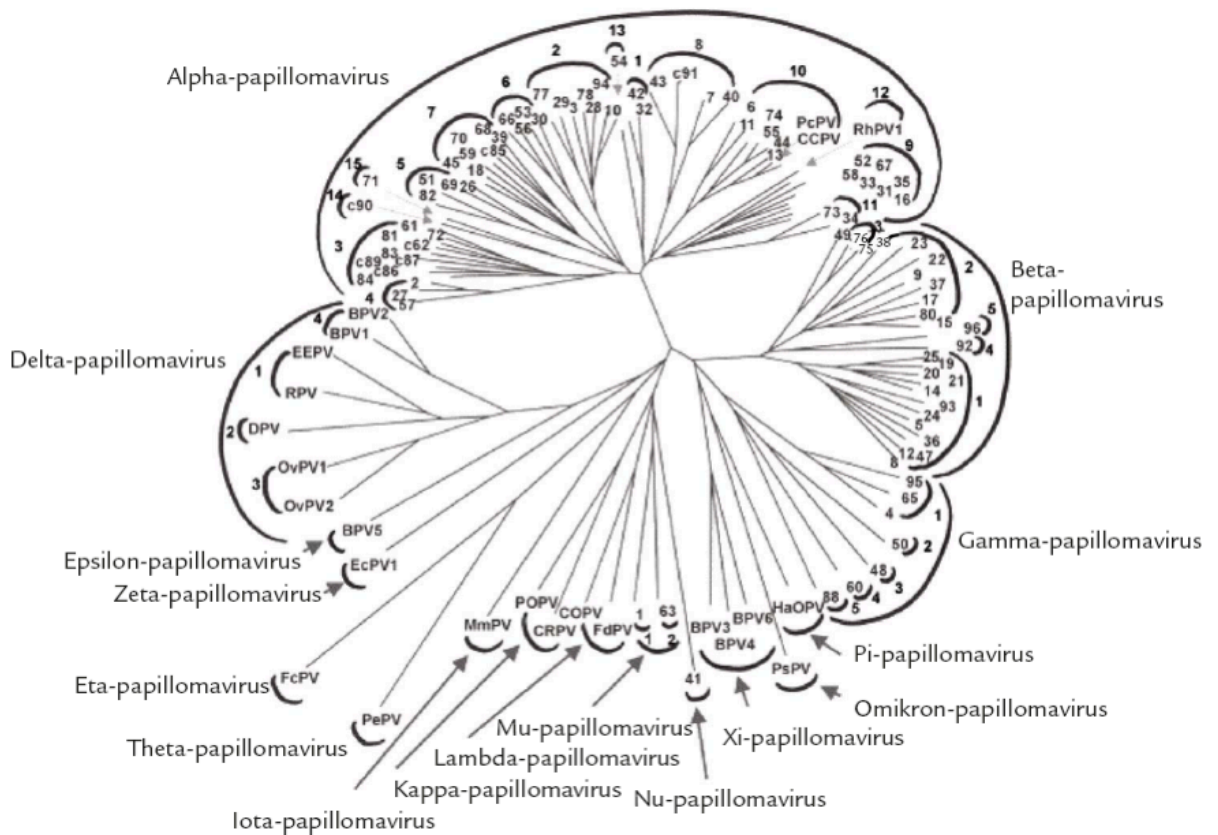


Figura 3: Filogenia do Papilomavírus. Árvore filogenética gerada a partir da diversidade genômica da sequência completa da ORF do gene L1 de 118 tipos de papilomavírus. Os números no final de cada ramo identificam um tipo de HPV; c-número refere-se a um candidato a tipo de HPV. Todas as outras abreviações referem-se a tipos de papilomavírus animais. Os símbolos mais externos aos semicírculos identificam um gênero, por exemplo, o gênero *Alphapapillomavirus*. Os números nos semicírculos internos referem-se às espécies. Para exemplificar tomamos o topo da figura, os HPVs tipos 7, 40, 43, e c91 juntos formam a espécie 8 do gênero *Alphapapillomavirus*, A8 (6, 41).

Tabela 2 – Características das espécies de gêneros específicos dos HPVs.

Gênero	Espécie	Tipos de HPV	Comentários
<i>Alphapapillomavirus</i>	1	32, 42	Mais frequente em lesões benignas (baixo risco). Mucosa oral ou genital.
	2	10, 3, 28, 29, 78, 94	Causam mais frequentemente lesões cutâneas a mucosas. E5 biologicamente diferente.
	3	61, 72, 81, 83, 84	Lesões mucosas. Muito baixo risco.

continua

Gênero	Espécie	Tipos de HPV	Comentários
	4	2, 27, 57	Verrugas de pele comuns. Frequentemente em lesões benignas em crianças. E5 biologicamente diferente.
	5	26, 51, 69, 82	Lesões mucosas de alto risco, também em lesões benignas.
	6	53, 30, 56, 66	Lesões mucosas de alto risco, mas também em benignas.
	7	18, 39, 45, 59, 68, 70	Lesões mucosas de alto risco.
	8	7, 40, 43	Lesões cutâneas e mucosas de baixo risco. HPV 7 também conhecido por verruga de açougueiro – muitas vezes em lesões de mucosa e pele de pacientes infectados pelo HIV.
	9	16, 31, 33, 35, 52, 58, 67	Alto risco – lesões mucosas malignas.
	10	6, 11, 13, 44, 74	Principalmente associados com lesões mucosas benignas. Baixo risco. Relatos de HPV 6 em carcinomas verrucosos.
	11	34, 73	Lesões mucosas – alto risco.
	13	54	Mucoso de baixo risco.
	15	71	Mucoso de baixo risco.

<i>Betapapilomavírus</i>			
Propriedades Biológicas: lesões cutâneas; infecção existe na forma latente na população em geral, ativado sob condições de imunossupressão.	1	5, 8, 12, 14, 19, 20, 21, 25, 36, 47, 93	Causam lesões cutâneas mais frequentemente, mas há relatos de DNA na mucosa. Comumente associados com lesões em Epidermodisplasia Verruciforme ou pacientes imunossuprimidos. Mais frequente em lesões benignas, mas também relatados em lesões malignas de pacientes imunocompetentes.

continuação

Gênero	Espécie	Tipos de HPV	Comentários
	2	9, 15, 17, 22, 23, 37, 38, 80	Causam lesões cutâneas mais frequentemente, mas há relatos de DNA na mucosa. Comumente associados com lesões em Epidermodisplasia Verruciforme ou pacientes imunossuprimidos. Mais frequente em lesões benignas, mas também relatados em lesões malignas de pacientes imunocompetentes.
	3	49, 75, 76	Lesões cutâneas benignas.
<i>Gammapapilomavírus</i>			
Propriedades Biológicas: lesões cutâneas; histologicamente distinguível por corpos de inclusão citoplasmáticos HPV tipo específico.	1	4, 65, 95	Lesões cutâneas. Histologicamente distinguível por corpos de inclusão citoplasmáticos homogêneos.
	2	48	Lesões cutâneas.
	3	50	Lesões cutâneas.
	4	60	Lesões cutâneas.
	5	88	Lesões cutâneas.

<i>Mupapilomavírus</i>				Histologicamente distinguível por corpos de inclusão citoplasmáticos heterogêneos.
Propriedades Biológicas: Lesões cutâneas;	1	1		
Histologicamente distinguível por corpos de inclusão citoplasmáticos tipo específico.	2	63		Histologicamente distinguível por corpos de inclusão citoplasmáticos filamentosos.

<i>Nupapilomavírus</i>				Vários ORFs descaracterizados espalhados por todo o genoma.
Propriedades Biológicas: Lesões cutâneas benignas e malignas.	1	41		

Adaptado das tabelas 2 e 3 do artigo de *de Villiers et al.*, 2003. A tabela mostra a divisão dos HPVs em gêneros e espécies, seguindo a árvore filogenética. Para cada espécie a tabela lista os tipos de HPVs e propriedades biológicas e patológicas de cada espécie (6).

Eles são nomeados pela sigla HPV (do inglês, *Human Papillomavirus*) seguida de um número que é dado sequencialmente, à medida que diferentes tipos têm seus genomas completamente caracterizados (6, 35). Testes de neutralização, que permitem a distinção entre sorotipos de vírus, não podiam ser realizados com os HPVs pela dificuldade em cultivá-los em células, por isso sua classificação é feita com base nas diferenças do próprio genoma. Assim, os tipos são genótipos e não sorotipos (42).

Os papilomavírus são altamente epiteliotróficos; especificamente, estabelecem infecções produtivas somente em epitélio estratificado da pele, do trato anogenital e da cavidade oral (35). Desse modo, eles podem ainda ser classificados em cutâneos e mucosotróficos, dependendo do tropismo pelo tecido infectado. Cutâneos têm afinidade pelo epitélio escamoso queratinizado (infectam a pele) e mucosotróficos as mucosas urogenital, anal, oral e respiratória (43). Os HPVs são ainda divididos em baixo ou alto risco oncogênico, de acordo com o potencial de progressão do tecido infectado para neoplasias (44). Os HPVs que são preferencialmente encontrados em cânceres cervicais e outros cânceres anogenitais são designados de tipos de alto risco (HPV 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, 35, 59, 56, 51,

39, 68, 73, 82, 53, 66 e 70), reciprocamente, aqueles que são principalmente encontrados em verrugas genitais ou lesões não malignas são designados por tipos de baixo risco (HPV 6, 11, 40, 42, 43 e 44/55) (**Tabela 3**) (7, 43, 45, 46).

Tabela 3 – Classificação dos tipos de HPV de acordo com a localização da lesão.

Localização	Tipos de HPV
Cutânea	1, 4, 41, 48, 60, 63, 65, 76, 77, 88, 95
Mucosa	6, 11, 13, 16, 18, 26, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 72, 73, 74, 81, 82, 83, 84, 86, 87, 89
Cutânea e/ou Mucosa	2, 3, 7, 10, 27, 28, 29, 40, 43, 57, 61, 62, 78, 91, 94, 101, 103
Cutânea associada à Epidermodisplasia Verruciforme	5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20/46*, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 49, 50, 80, 75, 92, 93, 96, 107

Localizações mais frequentes: cutâneos, mucosos (genitais), cutâneos e/ou mucosos e cutâneos associados à epidermodisplasia verruciforme. Fonte: (47)

1.2 DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA DO HPV

O tipo de HPV é um importante fator de risco para a progressão diferencial do câncer cervical. Aproximadamente 14 tipos oncogênicos estão diretamente relacionados ao desenvolvimento desse tipo de câncer e suas lesões precursoras (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68) (2). Atualmente, pouco se sabe sobre a distribuição e prevalência dos tipos de HPV no Distrito Federal.

A prevalência da infecção por HPV varia consideravelmente em todo o mundo. Embora o HPV 16 seja o tipo mais comumente encontrado em mulheres saudáveis e pacientes com câncer cervical, outros genótipos virais exibem uma distribuição heterogênea. Tendo em conta o desenvolvimento de vacinas profiláticas HPV específicas, estudos epidemiológicos em diferentes áreas geográficas são necessários para determinar o papel da infecção do HPV em diferentes países antes de uma implantação em larga escala de campanhas de vacinação. De um ponto de vista epidemiológico, é necessário conhecer a incidência dos diferentes tipos de HPV para que se possam aplicar medidas diagnósticas, preventivas e terapêuticas mais precisas (26).

Em três estudos distintos, realizados em 3 países Europeus, foi possível identificar diferenças na distribuição genotípica e positividade para HPV. Itália (Piana *et al.*, 2011), Espanha (Otero-Motta *et al.*, 2011) e França (Vaucel *et al.*, 2011) tiveram positividade para HPV de 35,9%, 20,3% e 29,38%, respectivamente (10, 26, 48). Na Espanha, os cinco tipos de HPV mais frequentes em ordem decrescente foram HPV 16, 53, 51, 6 e 66 e na Itália a distribuição foi o HPV 16 como o mais frequente, seguido dos tipos 51, 6, 31 e 53. Dentre os cinco tipos mais prevalentes nesses dois países, quatro coincidem, porém somente o HPV 16 lidera a prevalência em ambos os países, os demais genótipos possuem proporções diferentes. O estudo Frances, distribuiu os genótipos de acordo com a lesão citológica ou histológica apresentadas em diferentes amostras. Nas amostras onde foi realizado o exame citológico, elas tiveram como resultados, diagnóstico normal, ACUS, LSIL e HSIL e apresentaram os tipos HPV 16, 53 e 6, como os três mais frequentes. O tipo 16 permanece como o genótipo mais frequente em todos os tipos de lesões e a proporção de HPV de alto risco aumenta de acordo com o aumento da gravidade do diagnóstico citológico, e o mesmo acontece no histológico. Na histologia, os tipos HPV 16 e 53 foram mais comuns em resultados normais e de NIC I. O HPV 18 foi detectado entre pelo menos os quatro tipos mais frequentes em resultados normais, NIC I e NIC II. Em NIC III, além do HPV 16 permanecer como o tipo mais prevalente, o HPV 58 foi o segundo e HPV 31 e 53 apareceram em terceiro na ordem de frequência (10, 26, 48).

A China, em um estudo que investigava a prevalência de infecção cervical pelo HPV diagnosticou uma distribuição genotípica diferente do que é comumente identificado. A positividade encontrada foi de 13,3% e os cinco genótipos mais comuns em ordem decrescente foram HPV 52, 16, 58, 68 e 81. Diferentemente dos outros estudos, na China, o HPV 52 é o mais prevalente e o HPV 58 aparece como outro genótipo muito comum na população asiática (49).

Nos Brasil, foram encontrados diversos estudos que evidenciam a heterogeneidade na distribuição dos genótipos em amostras cervicais de diferentes estados do país. Uma pesquisa feita em dois municípios de status socioeconômico baixo do Rio de Janeiro (RJ), Duque de Caxias e Nova Iguaçu, compara a frequência encontrada em seu estudo com a de outros estados do Brasil. Quando comparado com João Pessoa no estado da Paraíba, a maior diferença observada foi entre o HPV 45 e 33, os quais na Paraíba tiveram prevalência de 3,1% e 13,5%

contra 7,6% e 3,0% nesses municípios do RJ, respectivamente. Em Recife, dois estudos diferentes, detectaram o HPV 31 em 21,4% e 15,5% das amostras, podendo observar uma frequência muito alta em relação aos 3,8% detectados nos dois municípios do RJ. Ao comparar Duque de Caxias e Nova Iguaçu com outra região metropolitana (melhor nível socioeconômico) do RJ, a diferença na proporção dos tipos HPV 16 e 31 que chama atenção, nas primeiras o 16 foi detectado em 28% dos casos contra 18,3% nas amostras da região metropolitana; já o HPV 31 apareceu em 12,2% dos casos na região de melhor nível socioeconômico contra 3,8% nos outros municípios. Em outro estudo realizado, no estado de São Paulo, a positividade encontrada foi de 35%. Os tipos de HPV de alto risco mais identificados foram HPV 16, 18, 31, 53, 58, 33 e 35; com os tipos 16 e 18 compreendendo 17% e 13% das amostras HPV-positivas, respectivamente (13). A diferença significativa na frequência dos tipos de HPV entre os estudos evidencia a necessidade de novas investigações para melhorar a informação da distribuição geográfica dos tipos de HPV no Brasil, utilizando metodologias padronizadas (50).

A distribuição genotípica de HPV nos homens ainda é pouco conhecida. Estudos sobre a relação HPV e doença no homem ainda são escassos, mas estão em ascensão. A prevalência do DNA-HPV no sexo masculino tem sido descrita entre 3,6% e 84%. Um estudo multinacional reportou recentemente que 50,5% dos homens foram positivos para pelo menos um genótipo de HPV conhecido e um adicional de 14,7%, foram positivos para um tipo de HPV desconhecido. Dado que a maioria dos estudos detecta somente tipos mucosos, é possível que tipos cutâneos façam parte das infecções não classificadas. Em duas pequenas séries de casos, tipos de HPV cutâneos oncogênicos, HPV 5 e 8, foram detectados em 6% e 11% dos tumores de pênis, respectivamente (1).

Em estudo feito com homens na faixa etária de 18 a 70 anos, no Brasil, México e Estados Unidos, em amostras coletadas da glândula/sulco coronal (coroa da glândula), eixo e escroto, além do prepúcio de homens não circuncidados, a positividade foi de 51,3% e a prevalência de HPV foi de 43,5% nos Estados Unidos, 49,5% no México, e 59,7% no Brasil. Os tipos de HPV mais prevalentes foram HPV 62 (8,2%), HPV 84 (7,9%), HPV 16 (7,5%) e HPV 51 (6,3%). A distribuição foi parecida nos três países, com exceção do HPV 16 que teve menor prevalência no México (5,3%); no Brasil foi de 9,2% e nos Estados Unidos 8,0% (3). HPV é

altamente prevalente no sexo masculino e há um grande interesse em compreender melhor a relação entre a infecção por HPV nos homens e doenças relacionadas (1).

A distribuição genotípica de HPV nos homens ainda é pouco conhecida. Homens recrutados no México, Brasil e Estados Unidos foram testados para DNA do HPV, a positividade geral foi de 51,3%, com prevalência de 43,5% nos Estados Unidos, 49,5% no México e 59,7% no Brasil. Os genótipos mais comuns foram HPV 62 (8,2%), HPV 84 (7,9%), HPV 16 (7,5%), e HPV 51 (6,3%). A distribuição foi semelhante entre os três países, com exceção da pequena prevalência do HPV 16 no México (5,3%) comparada ao Brasil (9,2%) e Estados Unidos (8,0%) (3).

A prevalência consistentemente mais elevada nos homens sugere que as mulheres têm uma resposta imune mais forte. A prevalência de anticorpos para um ou mais dos tipos de HPV da vacina (tipos 6, 11, 16 e 18) foi significativamente maior entre as mulheres (32,5%) do que nos homens (12,2%). Uma possível explicação para essa diferença é que o epitélio queratinizado infectado por HPV é menos provável em induzir resposta imune que o epitélio mucoso (tecido mais comumente infectado nas mulheres). Variação nos relatos de prevalência são provavelmente devido às diferenças em técnicas de amostragem, diferenças na população estudada, nos sítios genitais amostrados, e nos métodos de detecção do DNA do HPV (tecnologias mais ou menos sensíveis) (1).

1.3 HPV E CÂNCER CERVICAL

A principal alteração que pode levar ao câncer do colo do útero é a infecção pelo HPV, praticamente todos os casos de câncer cervical (99%) estão ligados à infecção por esse vírus (51-53). Infecção persistente tem papel importante no desenvolvimento desse tipo de câncer. Nenhuma outra forma de câncer documenta melhor os efeitos da triagem, com diagnóstico precoce e tratamento adequado a probabilidade de cura pode chegar a 100% (51, 54).

Mesmo com esse alto poder de cura, o câncer do colo do útero é o segundo câncer mais comum em mulheres em todo o mundo, com cerca de 500.000 novos casos e 250.000 mortes a cada ano (51, 53, 54). Quase 80% dos casos ocorrem em países de baixa renda (53), como os da África, América Latina e Ásia. É a quarta causa de morte de mulheres por câncer no Brasil, por ano, faz 4.800 novas vítimas fatais e apresenta 18.430 novos casos (51). Segundo o Instituto Nacional de Câncer

– INCA, as estimativas de novos casos para 2012 no Brasil são de 17.540 casos e para o Distrito Federal são estimados 330 novos casos, com taxa bruta de 23,05 casos por 100 mil mulheres (12). Para os Estados Unidos, a estimativa de novos casos para 2012 é de 12.170 casos e 4.220 mortes de acordo com o *National Cancer Institute* (55).

O ponto mais crítico da carcinogênese cervical não é a aquisição da infecção, mas sim o passo envolvendo a progressão para lesões clinicamente importantes (14). A maioria das mulheres, em algum momento de suas vidas será infectada pelo HPV, no entanto, poucas irão evoluir para a doença invasiva (54, 56). A maioria das infecções por HPV é transitória e eliminada pela resposta imunológica no decorrer de meses. Em média, 50% das infecções por HPV são eliminadas dentro de 8 meses e 90% dentro de 2 anos (54). Praticamente nenhum estudo tenta separar fatores de risco para persistência viral daqueles para progressão neoplásica. Acredita-se que persistência em longo prazo sem progressão é incomum, mas com a falta de conhecimento exato sobre como definir infecção por HPV transitória, persistente e em longo prazo, estudos para tentar avaliar os fatores de risco para progressão dado uma infecção persistente podem ser muito valiosos (14).

Os fatores de risco para câncer cervical estão relacionados às características tanto do hospedeiro quanto do vírus, como exposição ao HPV, infecção simples/múltipla, oncogenicidade viral, ineficiência da resposta imunológica e presença de cofatores (5, 52, 54, 57, 58). Pesquisadores dividiram os cofatores em 3 grupos:

- 1- Cofatores ambientais ou exógenos: contraceptivo oral, tabagismo, dieta, trauma cervical, coinfeção com HIV ou outras doenças sexualmente transmissíveis (DSTs);
- 2- Cofatores virais: infecção por tipos específicos de HPV, coinfeção por outros tipos de HPV, carga e integração viral;
- 3- Cofatores relacionados ao hospedeiro: hormônios endógenos, fatores genéticos e fatores relacionados à resposta imune (59).

Os HPVs infectam as células basais imaturas do epitélio escamoso em área de ruptura epitelial ou células metaplásicas imaturas presentes na junção escamocolunar. O colo uterino, com suas áreas relativamente grandes de epitélio metaplásico escamoso imaturo, é particularmente vulnerável à infecção por HPV quando comparado, por exemplo, com a pele e a mucosa da vulva, que são

cobertas por células escamosas maduras. Esta diferença na suscetibilidade epitelial à infecção por HPV pode explicar a acentuada diferença na incidência de cânceres relacionados à HPV originados em diferentes locais, e também a alta frequência de câncer cervical em mulheres ou câncer anal em homens homossexuais e a frequência relativamente baixa de câncer vulvar e peniano (54).

A triagem por esfregaço de Papanicolaou não apenas aumentou a detecção de cânceres de baixo estágio potencialmente curáveis, mas também permitiu a detecção e erradicação de lesões pré-invasivas, algumas que teriam progredido para câncer se não fossem descobertas e tratadas (54). Mesmo assim, exames citológicos e histológicos não distinguem de forma confiável as poucas mulheres com esfregaços anormais que irá progredir para câncer invasivo da grande maioria dessas anormalidades que irão regredir espontaneamente (56). O tipo de HPV é provavelmente mais importante do que a presença ou ausência de evidências microscópicas de infecção leve na predição de risco de câncer, porque tipos não carcinogênicos também frequentemente causam anormalidades citológicas e histológicas. Anormalidades microscópicas são diagnosticadas em apenas uma pequena minoria de mulheres com HPV detectável por testes de DNA, esta fração depende dos testes moleculares e microscópicos e do genótipo do HPV (14).

Prova disso está nos dados de um estudo realizado no noroeste da Espanha, onde 54,9% das amostras diagnosticadas citologicamente como “negativas para lesões intraepiteliais e neoplasias”, apresentavam infecção múltipla para HPV e 45,1%, infecções simples. HPV 16 foi detectado em 17,6% dessas infecções simples e o HPV 51 em 40,3% das múltiplas. Houve uma alta incidência de HPV 6 em infecções simples (11,8%) e múltiplas (17,7%) (26). Associar a citologia ao exame de genotipagem para HPV pode ser uma importante arma diagnóstica para prever risco de câncer cervical.

1.4 HPV E CÂNCER PENIANO

Mundialmente, 5,2% de todos os cânceres penianos podem ser atribuídos à infecção pelo HPV, embora tenha aumentando o interesse em entender a responsabilidade dessa infecção e comorbidades relacionadas em homens, estudos nesse grupo ainda são bastante limitados (60). Respeitando-se as diferenças populacionais e metodológicas, além do sítio genital amostrado (1), a prevalência do

DNA HPV no sexo masculino tem sido descrita entre 3,6% e 84%. Os maiores índices (63%-84%) foram detectados em homens frequentadores de clínicas de DST (24, 61). A faixa etária mais atingida pela população está entre 18 e 28 anos de idade (24).

A prevalência de HPV em tumores no pênis varia de 29% a 82% dependendo da distribuição nos tipos histopatológicos, na população estudada e na área da genitália amostrada (60, 62). Estudos relatam a presença de HPV em 100% dos carcinomas in situ, 47,4% no carcinoma basalóide e 35% no carcinoma escamoso convencional (63). Comparado com infecção cervical pelo HPV, relativamente pouco se sabe sobre a epidemiologia dessa infecção viral em homens (64). A zona de transformação do colo é altamente suscetível à malignização, contrariamente ao epitélio peniano. Além do mais, o pênis é uma estrutura externa, não está sujeito aos mesmos cofatores ativos cervicais e também possui maior facilidade de higiene (61). Embora a associação entre HPV e a carcinogênese peniana ainda requeira elucidação, o vírus é potencialmente carcinogênico entre as mulheres, podendo ter alguma participação entre os homens (64); tanto pelos efeitos da doença como pelo risco de transmissão para as mulheres, a infecção no homem é uma preocupação importante (25). Assim, cresce o interesse na detecção de HPV no sexo masculino (61).

Dentre os fatores de risco para aquisição de HPV no homem, destaca-se o comportamento sexual de risco como o alto número de parceiros sexuais, idade da primeira relação sexual e a falta de uso do preservativo (o efeito protetor da camisinha tem sido relatado, mas a transmissão continua ocorrendo através das áreas desprotegidas) (60, 62). Outro fator é a falta de circuncisão, a redução do risco de infecção por HPV entre homens circuncidados varia de 60% a 80%. Além disso, estudos avaliaram a associação entre circuncisão, clearance e persistência da infecção, sugerindo que a maior prevalência de HPV entre os homens não circuncidados podem ser atribuídas a uma maior duração da infecção, em vez de uma maior taxa de aquisição (60, 62, 63). Parceira sexual com NIC; histórico de outras DSTs e tabagismo também são relatados como fatores de risco para infecção por HPV (25).

Nos homens, a infecção por HPV contribui para doenças como verruga genital e diversos cânceres, incluindo câncer do ânus e do pênis (25, 60). Embora vários tipos de HPV sejam encontrados na genitália externa do homem, para nosso

conhecimento, não há informação disponível se certas combinações de tipos de HPV possam ser encontradas juntas em uma coinfeção com maior ou menor frequência do que seria esperado por transmissão sexual e fatores de riscos comuns. Essa questão é particularmente relevante para informar o acompanhamento dos benefícios da vacinação de mulheres ou homens sobre a incidência de infecção por HPV em homens (3).

Outra consequência clínica importante da infecção por HPV no homem é o potencial em infectar mulheres (25, 60). Transmissão sexual do HPV é um fato bem conhecido, e agora existem vários estudos mostrando a influencia da infecção masculina sobre a infecção e doença nas mulheres. Lesões penianas são frequentemente encontradas em parceiros sexuais de mulheres com NIC. Regressão das lesões penianas é significativamente mais lenta nos homens cujos parceiros estão infectados com o mesmo tipo de HPV. Vários estudos têm demonstrado que os maridos das mulheres com câncer cervical ou carcinoma cervical in situ têm maior prevalência de HPV do que o marido das mulheres controle. O risco de câncer cervical mostrou-se aumentado devido a vários comportamentos praticados pelos parceiros do sexo masculino, incluindo múltiplos parceiros sexuais e contato com prostitutas (25). Existe uma lacuna de conhecimento em relação à história natural da infecção pelo HPV e progressão da doença em homens (62).

1.5 CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES ASSOCIADAS AO PAPILOMAVÍRUS HUMANO – CITOPATOLÓGICAS E HISTOPATOLÓGICAS

A comprovação de que o câncer escamoso invasivo do colo do útero é precedido por uma transformação maligna do seu epitélio de origem, teve lugar nos primeiros anos do século XX. Essas lesões precursoras, inicialmente denominadas “carcinomas de superfície”, foram rapidamente rebatizadas com o nome de “carcinomas in situ” (CIS) e, mais tarde subdividas em várias categorias de “displasias” ou neoplasias intraepiteliais cervicais. As técnicas citológicas e colposcópicas contribuíram significativamente para que se pudesse conhecer a história natural dessas lesões (57).

Desde que o Dr. George Papanicolaou tentou classificar as células que observava, acreditando ser a representação de lesões neoplásicas, ocorreram

diversas modificações que incorporaram progressivamente o conhecimento adquirido sobre a história natural dessas lesões, sempre na tentativa de melhorar a correlação cito-histológica (65). Papanicolaou criou, em 1943, uma nomenclatura que procurava expressar se as células observadas eram normais ou não, atribuindo-lhes uma classificação. Assim, falava-se em “Classes” – I, II, III, IV e V, em que Classe I – indicava ausência de células atípicas ou anormais; Classe II – citologia atípica, mas sem evidência de malignidade; Classe III – citologia sugestiva, mas não conclusiva, de malignidade; Classe IV – citologia fortemente sugestiva de malignidade; Classe V – citologia conclusiva de malignidade (65, 66). Essa classificação se preocupava pouco com os aspectos histológicos das lesões que sugeriam, a partir de então, novas nomenclaturas surgiram, mais atentas a esse significado (65, 67).

O termo displasia foi introduzido por Papanicolaou em 1949 para designar a atipia epitelial cervical intermediária entre o epitélio normal e o CIS (65, 66). A displasia, em 1953, recebeu uma categorização adicional em três grupos – leve, moderada e acentuada – dependendo do grau de comprometimento da espessura epitelial por células atípicas (65, 66, 68). Essas se referem à Classe III de Papanicolaou, correlacionando, também, a Classe IV com carcinomas escamosos in situ. A Classe V continuou a indicar carcinoma invasor, e, pela primeira vez, se deu ênfase a alterações celulares, devido à ação do HPV, relatando-se a coilocitose (65). Baseado nos achados de vários estudos de seguimento com as mulheres portadoras de tais lesões observou-se que alguns casos de displasia regrediam, alguns persistiam e outros progrediam a CIS. Uma correlação direta com progressão e grau histológico foi verificada. Essas observações levaram ao conceito de um único processo patológico contínuo pelo qual o epitélio normal evolui à lesões precursoras epiteliais e à neoplasia invasiva. Com isso, o termo neoplasia intraepitelial cervical (NIC) foi introduzido por Richart, em 1967, para indicar uma gama de atipia celular limitada ao epitélio. A NIC foi dividida, histologicamente em três graus: NIC I, que correspondia à displasia leve, caracterizada por atipias celulares localizadas no terço inferior do epitélio escamoso; NIC II à displasia moderada, em que as atipias ocupam os dois terços inferiores desse epitélio; e NIC III à displasia grave e CIS, em que as células atípicas comprometem mais de dois terços ou toda a espessura do epitélio (66, 68). A NIC I, a NIC II e a NIC III

correspondem, respectivamente, a displasia leve, displasia moderada e displasia acentuada/carcinoma *in situ* (66).

Em 1988, na cidade de Bethesda, Maryland, Estados Unidos da América, foi criado um novo sistema de classificação citológica cervical com terminologia uniforme, com vistas a facilitar o manejo clínico das NIC. Esse mesmo sistema foi revisto em 2001 (66). O Sistema Bethesda (TBS) tinha como principal objetivo, um sistema representativo claro e relevante para o clínico; com informações clínicas relevantes, uniformes e reprodutíveis entre diferentes patologistas, refletindo a compreensão mais atual da neoplasia cervical (69), além de estabelecer normas de classificação citológica para reduzir as dúvidas diagnósticas entre alterações celulares benignas e realmente atípicas (19). A característica principal do TBS foi a criação do termo lesão intraepitelial escamosa (SIL - *squamous intraepithelial lesion*) e um esquema de dois graus que compreendia classificar NIC I em lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL – *low-grade squamous intraepithelial lesion*) e agrupar NIC II e NIC III em lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL – *high-grade squamous intraepithelial lesion*) (19, 66). O termo lesão foi usado para enfatizar que qualquer uma das alterações morfológicas em que se baseia um diagnóstico não identifica necessariamente um processo neoplásico. Embora elaborado para a notificação citológica, o TBS é também usado para informar sobre achados histopatológicos (68). No TBS também foi introduzida a classificação atípicas de significado indeterminado (do inglês ASCUS – *atypical squamous cells of undetermined significance*), sendo definido como achados citológicos caracterizados pela presença de alterações celulares insuficientes para o diagnóstico de lesão intraepitelial. Essa nova categoria apresentou limitações por não definir se as alterações citológicas eram reparativas ou neoplásicas. Essa categoria foi reclassificada na revisão de 2001 em ASC-US – células escamosas atípicas de significado indeterminado e ASC-H – células escamosas atípicas não podendo se excluir lesão de alto grau (19, 66, 69).

No Brasil, a nomenclatura baseada no Sistema Bethesda, somente foi incorporada pelos laboratórios de citopatologia que prestam serviços ao Sistema Único de Saúde (SUS) a partir de 1998, com a implantação, em todo o país, do Programa Viva Mulher – Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero e de Mama. A adoção do TBS, ainda que adaptado ao Brasil, facilita a comparação de resultados nacionais com os encontrados em publicações

estrangeiras. Foi elaborada uma publicação denominada, Nomenclatura Brasileira para Laudos Cervicais e Condutas Preconizadas (**Quadro 1**), com a finalidade de orientar a atenção às mulheres, auxiliando tecnicamente os profissionais de saúde, disponibilizando conhecimentos de maneira sintética e acessível que possibilitem tomar condutas adequadas em relação ao controle do câncer do colo do útero (65).

A inovação da nomenclatura brasileira criou uma categoria separada para todas as atipias de significado indeterminado e, mais ainda, a categoria “de origem indefinida” destinada àquelas situações em que não se pode estabelecer com clareza a origem da célula atípica (19, 65). Essa categoria tem baixa prevalência, foram registrados em 0,5% entre os exames alterados e em 0,015% entre todos os exames realizados. É um diagnóstico muito incomum, em que uma revisão cuidadosa da lâmina, na maioria dos casos, resultará no encontro de campos de atipias de células glandulares ou escamosas (19).

Quadro 1 – Nomenclatura Brasileira para Laudos Cervicais e Condutas Preconizadas.

Tipo da Amostra	Citologia convencional Citologia em meio líquido	
Avaliação pré-analítica	Critérios de rejeição da amostra: ausência de identificação da lâmina; identificação não coincide com o formulário/cadastro do paciente; lâmina danificada ou ausente; causas alheias ao laboratório (especificar).	
Adequabilidade da amostra	Satisfatória	Amostra que apresenta células em quantidade representativa, bem distribuídas, fixadas e coradas.
	Insatisfatória	Material acelular ou hipocelular (<10% do esfregaço); Leitura prejudicada (>75% do esfregaço) por presença de sangue, piócitos, artefatos de dessecação, contaminantes externos, superposição celular intensa
Epitélios	Escamoso	

apresentados na amostra	Glandular (não inclui o epitélio endometrial)		
	Metaplásico (a presença de células metaplásicas ou endocervicais representativas da junção escamocolunar, tem sido considerada como indicador da qualidade do exame, pelo fato de as mesmas se originarem do local onde se situa a quase totalidade dos cânceres do colo do útero.)		
Diagnóstico descritivo	Dentro dos limites da normalidade no material examinado		
	Alterações celulares benignas	Inflamação;	
		Reparação;	
		Metaplasia escamosa imatura;	
		Atrofia com inflamação;	
	Radiação		
	Atipias celulares	Células atípicas de significado indeterminado	Escamosas (ASCUS)
Glandulares			
De origem indefinida			

continua

		Em células escamosas	Lesão intraepitelial de baixo grau (compreendendo efeito citopático pelo HPV e neoplasia intraepitelial cervical grau I)
			Lesão intraepitelial de alto grau (compreendendo neoplasias intraepiteliais cervicais grau II e III)
			Lesão intraepitelial de alto grau, não podendo excluir micro-invasão
			Carcinoma epidermoide invasor

		Em células glandulares	Adenocarcinoma in situ	
			Adenocarcinoma invasor	Cervical
				Endometrial

*ASC-US – alterações escamosas atípicas de significado indeterminado não neoplásico; **ASC-H – alterações escamosas atípicas de significado indeterminado em que não se pode afastar lesão de alto grau. Adaptado de: Nomenclatura Brasileira para Laudos Cervicais e Condutas Preconizadas: Recomendações para Profissionais de Saúde. Rio de Janeiro: INCA. 2006 (65).

1.6 DIAGNÓSTICO CITOPATOLÓGICO

A avaliação microscópica dos esfregaços cérvico-vaginais desempenha um papel fundamental na detecção das lesões pré-cancerosas e do câncer inicial do colo do útero. O princípio da citologia ginecológica é simples: nos esfregaços, as imagens microscópicas de células normais, registradas na memória visual, são comparadas às imagens de células desconhecidas, as quais são o objeto do estudo em questão. Caso as células desconhecidas sejam muito semelhantes às normais, considera-se o esfregaço dentro dos limites da normalidade. Caso as imagens variem, o esfregaço deve ser considerado anormal, exigindo uma análise mais detalhada (57).

O exame citológico é um exame de rastreio e não de diagnóstico definitivo. A citologia é utilizada desde a década de 50 como método primário de diagnóstico preventivo, pois relacionando custo/benefício e eficácia, é o método mais apropriado de rastreamento em grandes populações (screening). Na rede pública de saúde é a forma de diagnóstico principal e praticamente exclusiva, utilizando-se basicamente os meios de coloração de Papanicolaou (67). Na mucosa vaginal de uma mulher adulta, são facilmente identificadas as seguintes células: células da porção interna da camada basal (células basais), células da porção externa da camada basal (células parabasais), células da camada intermediária, células pré-queratinizadas e células queratinizadas (70); as quais estão representadas pelos tipos celulares escamoso; glandular ou colunar; e metaplásicas (71). Baseando-se nas proporções dos tipos de células que aparecem em um esfregaço vaginal podem ser observadas células cancerosas, permitindo a descoberta precoce do câncer cervical (70).

Duas técnicas de coleta são utilizadas: esfoliativa e abrasiva. Um exemplo de citologia esfoliativa é o esfregaço vaginal, que se baseia na obtenção de células que descamam espontaneamente das superfícies do colo e da vagina. A citologia abrasiva depende da remoção de células das superfícies da cérvix, da endocérvice e da vagina com o auxílio de um instrumento, espátula de Ayre ou escova endocervical. O esfregaço vaginal é preparado com o material removido do fundo da vagina, além das células epiteliais descamadas dos epitélios vaginal e cervical, a amostra apresenta também muco, leucócitos, macrófagos e detritos celulares. Mais raramente podem-se encontrar células de origem endometrial, tubária e ovariana, além de bactérias, vírus, fungos e parasitas. A vantagem desse tipo de esfregaço é a boa representatividade de células com origem em todos os segmentos do trato genital; a desvantagem é, principalmente, o mau estado de conservação dessas células. São mais eficazes que os esfregaços cervicais na detecção de tumores ocultos do endométrio, das tubas e ovários. O esfregaço cervical permite a amostragem simultânea do canal endocervical e da ectocérvice. A citologia abrasiva é superior ao esfregaço vaginal no que diz respeito à detecção de lesões pré-cancerosas e cancerosas da cérvix uterina (57).

A coloração do esfregaço facilita o reconhecimento dos componentes celulares. Os núcleos captam os elementos basofílicos dos corantes, assumindo uma cor azul ou tom azulado; já o citoplasma pode adquirir uma cor rosa (eosinofílico) ou azul (cianofílico). A coloração de Papanicolaou é empregada de forma universal na citologia ginecológica. Todas as técnicas respeitam os mesmos princípios: núcleos corados pela hematoxilina, que tratada com óxido de mercúrio é transformada em hemateína; a cor azul do núcleo é intensificada após seu tratamento com alumínio-sulfato de amônia (ALUM). Um esfregaço adequado deve ser representativo de todas as superfícies epiteliais do colo e da vagina, bem como precisa conter um número suficiente de células que permita o reconhecimento de qualquer alteração (**Figura 4**) (57).

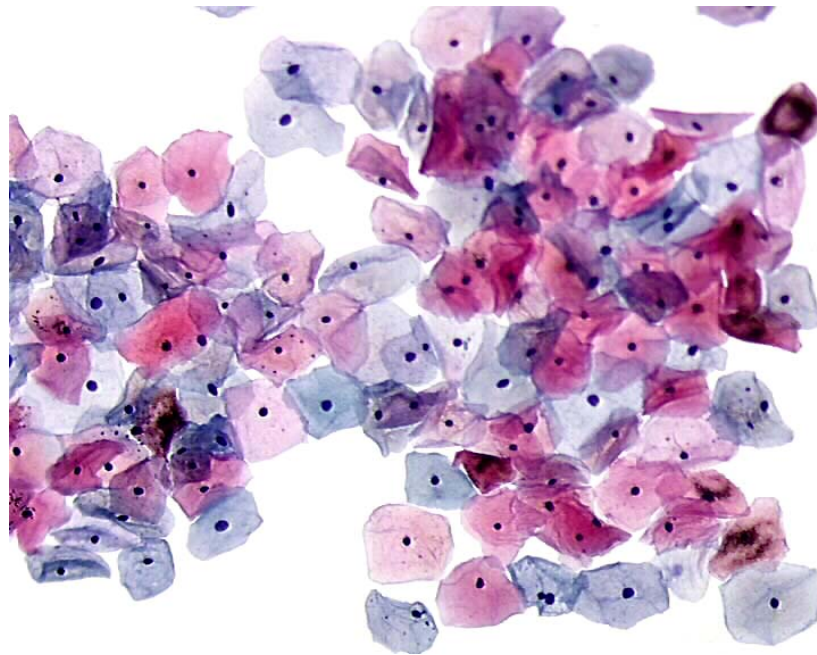


Figura 4: Ectocérvice normal. Citologia cervical com representação de células escamosas intermediárias basofílicas e células superficiais com citoplasmas basofílico ou eosinofílico (objetiva 10x). Fonte: IARC.

O diagnóstico da infecção por HPV é feito quando, no esfregaço cérvico-vaginal, são encontrados efeitos citopáticos produzidos por esse vírus. Dentre esses efeitos destaca-se a coilocitose, a qual se caracteriza pela presença de uma cavidade citoplasmática perinuclear clara e com borda citoplasmática periférica densa, associada a alterações nucleares (68, 72). As alterações nucleares são representadas por aumento de volume nuclear, irregularidade da membrana nuclear, cromatina grosseira e mal distribuída. Outra alteração consiste na disceratose, caracterizada por células que apresentam queratinização anômala ou prematura, nem sempre acompanhada de características nucleares de malignidade (67, 72). A disceratose ocorre nas camadas superficiais e profundas, é evidenciada pela presença de células orangiofílicas que se apresentam isoladas ou agregadas entre si. Nesse caso o citoplasma fica amarelado, como o próprio nome sugere, o núcleo fica pequeno, com aspecto condensado, podendo ter formato irregular. O núcleo torna-se hiper Cromático, irregular e às vezes ocorre multinucleação (67, 73).

A coilocitose é mais evidente na superfície da lesão, estando por vezes associada a uma camada superficial de células queratinizadas que recebe o nome de hiper ceratose ou paraceratose. A hiper ceratose e a paraceratose são também associadas à infecção por HPV. A paraceratose aparece como células escamosas superficiais com núcleos pequenos, picnóticos e hiper Cromáticos (há retenção dos

núcleos). A hiperqueratose caracteriza-se pelo espessamento da camada superficial com perda do núcleo (**Figura 5**) (57, 72).

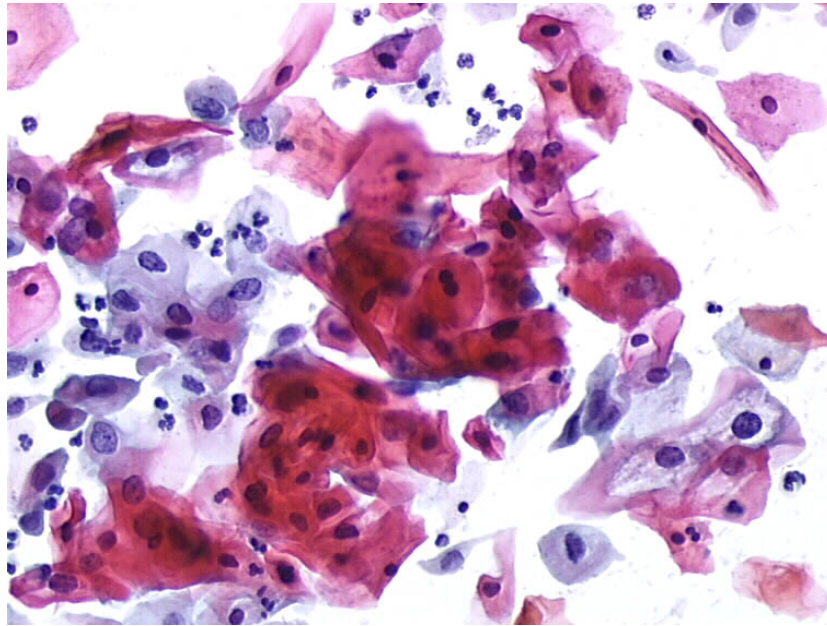


Figura 5: LSIL. Citologia cervical característica de uma LSIL. Células escamosas eosinofílicas, com citoplasma denso, paraceratose e alguns coilocitos. (objetiva 20x). Fonte: IARC.

1.6.1 Lesões Inflamatórias

Inflamação é a resposta dos tecidos às lesões ocasionadas por vários agentes, tais como bactérias, vírus, fungos, parasitas, trauma, reações químicas, calor, frio ou radiação. Os processos inflamatórios são agudos ou crônicos e podem ser reconhecidos nos esfregaços cérvico-vaginais. Independente da causa, as reações inflamatórias estão representadas por um exsudato inflamatório composto por leucócitos, macrófagos e detritos que constituem uma evidência de necrose celular (57).

Eritrócitos, tanto preservados como fragmentados, são comuns nos tecidos lesados. O achado de macrófago com pigmento sanguíneo (hemossiderina) em seu citoplasma é indicador de hemorragia crônica ou progressiva. Nos esfregaços inflamatórios, as células escamosas podem apresentar núcleos discretamente aumentados e de contornos irregulares ou com cromatina condensada, sugerindo início de picnose. Caso evidencie aumento do volume nuclear restrito à poucas

células escamosas, esses elementos celulares poderão merecer a classificação de “células escamosas atípicas de significado indeterminado” (57).

1.6.2 Lesões Escamosas Intraepiteliais

O câncer invasivo do colo do útero é precedido por quadros intraepiteliais que recebem denominações variáveis, tais como lesão epidermóide ou escamosa intraepitelial, displasia e neoplasia intraepitelial cervical (NIC), sendo assim, uma lesão que progride muito lentamente. Histologicamente, as lesões pré-cancerosas da cérvix se caracterizam por desorganização da arquitetura do epitélio escamoso, atipias nucleares e mitoses anômalas. As lesões bem diferenciadas recebem o nome de NIC I (LSIL) enquanto aquelas com menor diferenciação são conhecidas como NIC II e NIC III (HSIL). Uma NIC pode regredir, persistir ou progredir para câncer invasivo, o risco da progressão está relacionado ao grau histológico da lesão (57).

Não há sintomas específicos nem características clínicas que indicam a presença de LSIL ou HSIL. Muitas dessas lesões, contudo, podem ficar brancas na aplicação de ácido acético a 3-5% e podem ser iodo negativo com a aplicação de solução de Lugol, já que o epitélio da NIC (LSIL ou HSIL) contém pouco ou nenhum glicogênio. A avaliação citológica, baseada em alterações nucleares e citoplasmáticas, é com frequência bastante difícil. Anomalias nucleares, como núcleos aumentados, maior razão núcleo/citoplasma, maior intensidade de coloração (hipercromasia), polimorfismo nuclear e variação do tamanho nuclear (anisocariose) são avaliados para fazer o diagnóstico (68).

O aumento do volume nuclear com variação no tamanho e forma, além da hipercromasia são características regulares de todas as células displásicas. Distribuição irregular de cromatina com grumos também está presente. Núcleos anormais em células superficiais ou intermediárias indicam uma LSIL, enquanto que a anomalia em núcleos de células basais e parabasais indicam HSIL. A quantidade de citoplasma com relação ao tamanho do núcleo (razão núcleo/citoplasma) é uma das características mais importantes para avaliar o grau da lesão. Proporções maiores estão associadas com HSIL. Em geral, um esfregaço cervical contém

células com uma variedade de alterações; portanto, a notificação dos achados implica em desafios consideráveis (68).

O conceito de “discariose” foi introduzindo, em 1949, por Papanicolaou, para descrever algumas alterações malignas iniciais nas células escamosas. Caracteriza-se pela alteração nuclear em elementos celulares com citoplasma morfológicamente normal ou quase normal. Os núcleos demonstram volume aumentado, contornos ou configuração irregulares e hipercromasia. No epitélio escamoso ela pode aparecer tanto nas células superficiais como nas intermediárias e parabasais. Os coilócitos são um tipo especial de células discarióticas e sua presença é considerada patognomônica da infecção pelo HPV. A discariose nas células escamosas superficiais e intermediárias costuma indicar a presença de uma LSIL; e nas células escamosas parabasais (metaplásicas) apontam para HSIL (57).

Características fundamentais das lesões pré-canceroras do epitélio cervical:

- Níveis variáveis de distúrbio e maturação e estratificação do epitélio, dependendo do tipo e da localização da lesão;
- Anomalias do tamanho e da forma das células;
- Anomalias nucleares:
 - aumento do tamanho do núcleo e da relação núcleo/citoplasma;
 - hipercromasia;
 - presença de atividade mitótica nas camadas acima da camada basal;
 - mitoses atípicas;
- Anomalias celulares produzidas pelo HPV, tal como a coilocitose (57).

1.6.2.1 Lesão Escamosa Intraepitelial de Baixo Grau (LSIL)

A maioria dessas lesões tem origem no epitélio escamoso maduro da cérvix. O fato de essa área estar exposta ao meio externo pode explicar a alta taxa de regressão espontânea dessas lesões. Os esfregaços são caracterizados pelo predomínio de células escamosas discarióticas superficiais e intermediárias. Tais células podem estar isoladas ou agrupadas, sendo elas numerosas ou raras. A distribuição da cromatina nos núcleos pode ser tanto grosseiramente granular como homogênea. Não são observados nucléolos. O citoplasma costuma ser transparente e cianofílico. A coilocitose é um achado comum nesse grupo de lesões. Um dos

componentes importantes das LSIL são as áreas onde descamam os coilócitos. Nos chamados condilomas planos, é comum observar espessamento do epitélio escamoso com poucas camadas de células achatadas em sua superfície e numerosos coilócitos (57).

Além da coilocitose pode apresentar também a disqueratose, a qual é caracterizada pela presença de lâminas ou aglomerados densos de pequenas células escamosas, com formato alongado elíptico, de citoplasma bastante eosinofílico e núcleos densos, pequenos e hipercromáticos. Tais células têm origem na superfície do epitélio. Foi constatado que os núcleos dos disqueratócitos podem conter partículas de HPV, no entanto, é possível encontrar células semelhantes sem que haja uma infecção confirmada por esse vírus (57).

Onze a 23% das pacientes com diagnóstico citológico de LSIL, a biópsia cervical revela HSIL (19, 65), o que aponta para possibilidade de subdiagnóstico no exame citopatológico. A maioria dessas alterações citológicas regride espontaneamente, na medida em que espelha a manifestação morfológica da infecção aguda e transitória pelo HPV. A prevalência de LSIL foi de 0,8% entre todos os exames citopatológicos realizados no Brasil em 2009 e considerando apenas os exames alterados, a prevalência foi de 31%, representando o segundo diagnóstico mais frequente (19).

1.6.2.2 Lesão Escamosa Intraepitelial de Alto Grau (HSIL)

Apresentam uma acentuada reestruturação do epitélio, podem variar em termos de características citoplasmáticas, tamanhos celulares e graus de alteração nuclear. As lesões de alto grau podem ser classificadas em lesões queratinizantes e diferenciadas do epitélio escamoso, lesões compostas de células com tamanho de médio a grande e lesões de células pequenas. Os três tipos podem coexistir (57).

As lesões queratinizantes são caracterizadas por células cancerosas que apresentam citoplasma intensamente queratinizado, espesso e de contornos irregulares. Podem surgir escamas anucleadas, reflexo da queratinização superficial. Citoplasma apresenta coloração alaranjada ou amarelada. As alterações citoplasmáticas são ocasionadas pela presença de queratina de alto peso molecular. Núcleos volumosos acentuadamente hipercromáticos e densos (**Figura 6**). O

formato das células é variável: algumas são ovais ou esféricas, enquanto outras são irregulares, alongadas ou fusiformes. Por vezes, são encontradas células semelhantes à coilócitos, fato este que atesta para a existência de um vínculo entre as lesões escamosas de baixo e alto grau. As lesões que correspondem a esse padrão celular estão habitualmente situadas no epitélio escamoso da cérvix e podem apresentar queratinização intensa, fazendo com que surjam na forma de placas brancas (leucoplasia) (57).

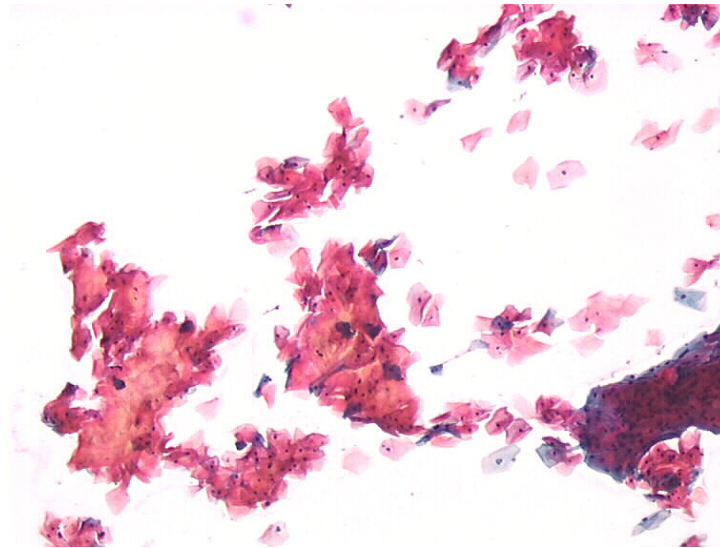


Figura 6: Hiperceratose. Citologia cervical evidenciando uma hiperceratose. Observam-se agregados de células anucleadas. (objetiva 5x). Fonte: IARC.

As lesões de células médias/grandes, como o próprio nome diz, são compostas por células de tamanho médio ou grandes e elevada relação núcleo/citoplasma, são facilmente reconhecíveis como malignas quando presente em um esfregaço. O tamanho dessas células corresponde, aproximadamente, ao das células escamosas parabasais. O citoplasma pode ser cianofílico ou eosinofílico. É possível encontrar multinucleação. O número de células anômalas aumenta proporcionalmente ao tamanho da lesão, porém ele também depende da qualidade do esfregaço. O terceiro tipo de HSIL, as lesões de células pequenas, tem origem nas células de reserva do epitélio endocervical. As células surgem de forma isolada, mas costumam formar agrupamentos compactos, no interior dos quais é difícil a diferenciação dos elementos celulares. Quando essas células descamam isoladamente, torna-se difícil sua identificação, pois elas passam a ser confundidas com leucócitos, macrófagos, células metaplásicas pequenas e, até mesmo, com

células endometriais. A relação núcleo/citoplasma é extremamente alta, pois os núcleos são muito grandes e circundados por uma fina faixa de citoplasma. A principal característica dessas células é o arranjo granular grosseiro de sua cromatina, que dá aos núcleos um aspecto granuloso (57).

Setenta a 75% das pacientes com esse diagnóstico apresentam confirmação histopatológica e 1% a 2% terão diagnóstico histopatológico de carcinoma invasor (19, 65). A prevalência desse diagnóstico no Brasil, em 2009, foi de 0,25% de todos os exames realizados e 9,7% de todos os exames alterados (19).

Quadro 2 – Resumo dos principais achados citológicos no diagnóstico de LSIL e HSIL.

Anomalias citológicas	LSIL	HSIL
Núcleo	Aumentado	Muito aumentado
Cromatina nuclear	Granular ou opaca (coilócitos)	Grosseiramente granular
Membrana nuclear	Pode ser irregular	Espessa e geralmente irregular
Mitoses	Raras em esfregaços	Relativamente comuns em esfregaços
Relação núcleo-citoplasma	Moderadamente aumentada	Acentuadamente aumentada
Citoplasma	Praticamente normal (células discarióticas) Zonas perinucleares claras (coilócitos)	Muito alterado; queratinizado e de formato bizarro (lesão queratinizada); escasso em outras lesões
Coilócitos	Geralmente presentes	Podem estar presentes em lesões queratinizadas

LSIL - lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; HSIL- lesão intraepitelial escamosa de alto grau. (57).

1.6.2.3 Atipias em Células Escamosas de Significado Indeterminado (ASCUS)

Refere-se às alterações citológicas sugestivas de lesão intraepitelial escamosa, mas que não são qualitativa ou quantitativamente suficientes para um resultado definitivo (69). O diagnóstico de ASCUS deve ser utilizado apenas quando o número de células escamosas maiores for pequeno ou quando a configuração dessas células torne impossível uma conclusão diagnóstica. Observa-se em muitos casos diagnosticados como ASCUS que a revisão cuidadosa do esfregaço por um segundo profissional qualificado acaba revelando evidências adicionais de uma lesão de baixo grau ou, até mesmo, de alto grau. As biópsias de cerca de um terço das pacientes com diagnóstico de ASCUS revelam alterações neoplásicas, sendo aproximadamente 30% dessas, lesões de alto grau, e 70% de baixo grau (57, 69). Acredita-se que a presença dos tipos de HPV considerados de alto risco pode colaborar na definição da lesão em pacientes com ASCUS. Em células parabasais ou metaplásicas, um diagnóstico de ASCUS, costuma ser uma denominação incorreta. Mulheres com anomalias nucleares nesses tipos celulares são, por definição, pacientes de alto risco, que podem ser portadoras de uma lesão de alto grau. Para os casos de ASCUS que continuam sendo classificados como suspeitos após uma revisão, recomenda-se uma avaliação cervical através do exame colposcópico (**Figura 7**) (57).

As células encontradas em ASCUS possuem o núcleo de duas e meia a três vezes o tamanho do núcleo de uma célula escamosa intermediária normal; a proporção núcleo/citoplasma fica ligeiramente aumentada, apresenta hipercromasia nuclear mínima e irregularidade na distribuição da cromatina ou da forma nuclear; as anormalidades nucleares podem estar associadas ao citoplasma orangeofílico denso (69).

As atipias escamosas foram divididas em alterações atípicas de significado indeterminado possivelmente não neoplásico (ASC-US) e em alterações escamosas atípicas de significado indeterminado em que não se pode afastar lesão de alto grau (ASC-H). Cerca de 5% a 17% das mulheres com ASC-US apresentam diagnóstico de HSIL e 0,1% a 0,2% de carcinoma invasor no exame histopatológico, demonstrando assim baixo risco de lesões mais avançadas. Para ASC-H, o risco de HSIL subjacente é alto, 24% a 94% (19, 65). A maioria das amostras com ASC-H apresenta as células alteradas dispersas, com pequenos fragmentos com menos de

dez células. O tamanho corresponde ao das células metaplásicas com o núcleo uma e meia a duas vezes e meia maior do que o núcleo normal, a proporção núcleo/citoplasma é aproximadamente a de HSIL (69).

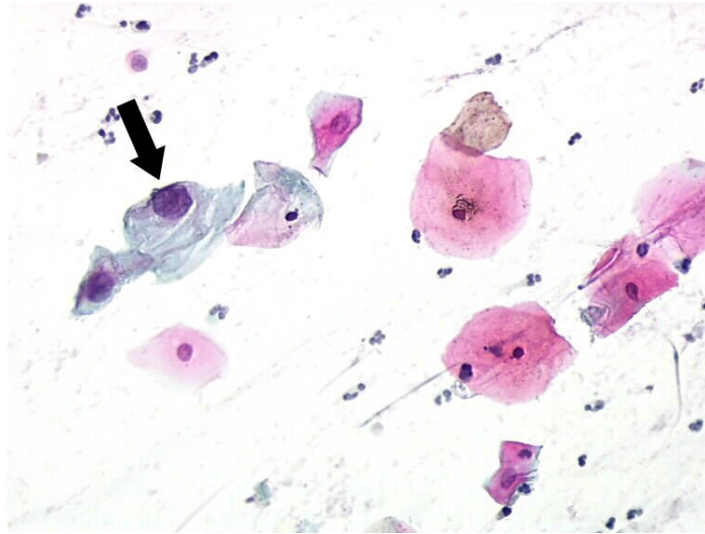


Figura 7: ASC-US. Citologia cervical característica de ASC-US. Ligeiramente inflamatório. Célula intermediária com núcleo alargado e cromatina homogênea. ASC-US (seta). (objetiva 20x). Fonte IARC.

1.7 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Na década de 90, dados de vários estudos epidemiológicos internacionais demonstraram que a infecção por um grupo de aproximadamente 15 tipos de HPVs carcinogênicos é causa necessária para o desenvolvimento de câncer cervical e suas lesões precursoras. Testes baseados na detecção do DNA do HPV foram introduzidos para melhorar a eficiência e maximizar a sensibilidade do rastreio do câncer cervical e lesões pré-invasivas (16, 18, 74, 75).

A grande variedade de estudos transversais que foram realizados demonstra que o teste de diagnóstico do HPV é 45% mais sensível que a citologia para detectar lesões NIC de alto grau (17). Estudos europeus e norte-americanos que demonstraram que o teste de HPV foi substancialmente mais sensível na detecção de NIC II ou lesão mais grave do que a citologia (96,1% versus 53%), mas menos específico (90,7% versus 96,3%), sugeriram o uso do teste de HPV como único método de rastreio primário, com a citologia reservada às mulheres HPV positivas (76).

Os ensaios longitudinais randomizados, como o estudo do rastreio populacional em Amsterdam (*Population-Based Screening Study Amsterdam Trial - POBASCAM*) e o estudo de novas tecnologias para o câncer do colo do útero (*The New Technologies for Cervical Cancer - NTCC*), demonstraram uma proteção melhorada contra a NIC de alto grau e o câncer cervical revelando uma redução média das lesões NIC III de cerca de 50% no grupo HPV positivo no segundo ciclo de rastreio (17, 77, 78). O grupo de estudo do NTCC sugere o uso do teste do DNA HPV para rastreamento cervical em mulheres de 35 anos ou mais (78). O estudo POBASCAM chegou à conclusão de que a implementação do teste de DNA do HPV no rastreamento cervical leva a uma detecção precoce clinicamente relevante de NIC II ou lesão mais grave, que quando adequadamente tratada, melhora a proteção contra NIC III e câncer cervical. Este estudo apoia o uso do teste de DNA de HPV para todas as mulheres de acima de 29 anos (77).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer, como no Brasil não há programas organizados de rastreamento de câncer do colo uterino, ainda que o desempenho diagnóstico dos testes moleculares em faixas etárias específicas e em conjunto com o exame citopatológico para os casos positivos tenha demonstrado resultados melhores em termos exclusivamente de desempenho diagnóstico, implementá-los no país, no atual nível de organização do rastreamento do câncer cervical, não permitirá que tais vantagens se convertam em benefícios reais (19). A detecção e identificação do HPV, tanto em amostras teciduais como celulares, dependem estritamente de análises moleculares da sequência do seu DNA, pois membros da família do HPV não se desenvolvem em meios de cultura *in vitro*. Os métodos realizados são baseados na identificação da presença de sequências de ácido nucleicos característicos do DNA do HPV através de sondas (67). Estes testes utilizando sondas de ácidos nucleicos vêm sendo disponibilizados comercialmente desde o início da década de 80 (72), e se baseiam no princípio da hibridização molecular. O DNA extraído das amostras é hibridizado com sondas específicas que correspondem ao DNA de um ou mais tipos conhecidos de HPV. Várias técnicas podem ser empregadas, elas possuem diferentes especificidades e sensibilidades (57).

1.7.1 Microarranjos

Microarrays de DNA, *chip* de DNA, *chip* biológico ou *biochip* são os nomes dados à mais nova tecnologia para análise dos ácidos nucleicos (79). Essa tecnologia consiste em lâminas de vidro nas quais segmentos de fita-única, chamados de sondas, são fixados e imobilizados de forma ordenada e em áreas específicas (chamadas de "célula de sonda"). Na lâmina, cada célula de sonda contém milhões de cópias de um determinado transcrito, ou um segmento gênico em particular, que pode posteriormente ser identificado (80).

O princípio da técnica baseia-se principalmente na propriedade de hibridização por complementaridade dos ácidos nucleicos e no fato das sondas apresentarem sequências similares às dos genes de interesse, e complementares às do RNA mensageiro ou às do DNA complementar, dependendo da tecnologia utilizada (80). Como cada sonda ocupa uma posição definida e conhecida na lâmina, o conjunto das sondas assim distribuídas forma uma *array* e a hibridização positiva indica as sequências no DNA alvo que se está testando (79).

Microarranjos de DNA permitem uma medição rápida e visualização de expressão diferencial entre genes de toda a escala genômica. Se a execução técnica é bastante complicada, o princípio é muito fácil (81). A genotipagem do HPV é muito importante, comparando com teste que detecta um *pool* de tipos de HPV, mas não distingue qual o tipo está presente, a genotipagem será melhor para monitorar infecção persistente com tipos carcinogênicos de HPV, que são pré-requisitos para progressão do câncer cervical (82).

Após a coleta da amostra cervical o DNA é extraído no laboratório. Pela metodologia do PapilloCheck® (Greiner Bio-One), um fragmento específico de DNA viral (gene E1) dos 24 subtipos de HPV é amplificado com *primers* (iniciadores) específicos de HPV pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (83). Essa metodologia consiste em uma reação de polimerização em cadeia, na qual se obtém o enriquecimento de sequências nucleotídicas alvo de DNA por meio de sua duplicação em modo exponencial. A técnica de PCR é tão sensível que uma única molécula de DNA pode, em teoria, servir como molde para amplificação (84). O princípio da técnica consiste em três etapas cíclicas: desnaturação térmica do DNA molde; anelamento de oligonucleotídeos sintéticos, que funcionam como os *primers* da reação de polimerização, a cada uma das fitas do DNA molde; e extensão ou

polimerização das novas fitas de DNA a partir de cada um dos iniciadores, utilizando cada um dos quatro dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) como substrato da reação de polimerização (**Figura 8**) (67).

Após vários ciclos de amplificação, nesse caso, existe uma última etapa de desnaturação das fitas duplas de DNA gerada, desse modo, surgem fragmentos únicos de DNA que, em seguida, são marcados com moléculas de fluoróforo. Depois, as peças marcadas e amplificadas, são hibridizadas por sondas de DNA que estão fixados no *chip* de DNA (metodologia do PapilloCheck®). Após a ligação, a análise é realizada com o CheckScanner™. Ao todo, 5 sistemas de controle evitam resultados falso-positivos ou falso-negativos. A avaliação e preparação do Relatório PapilloCheck® são feitas com ajuda de um *software* especial de análise (83).

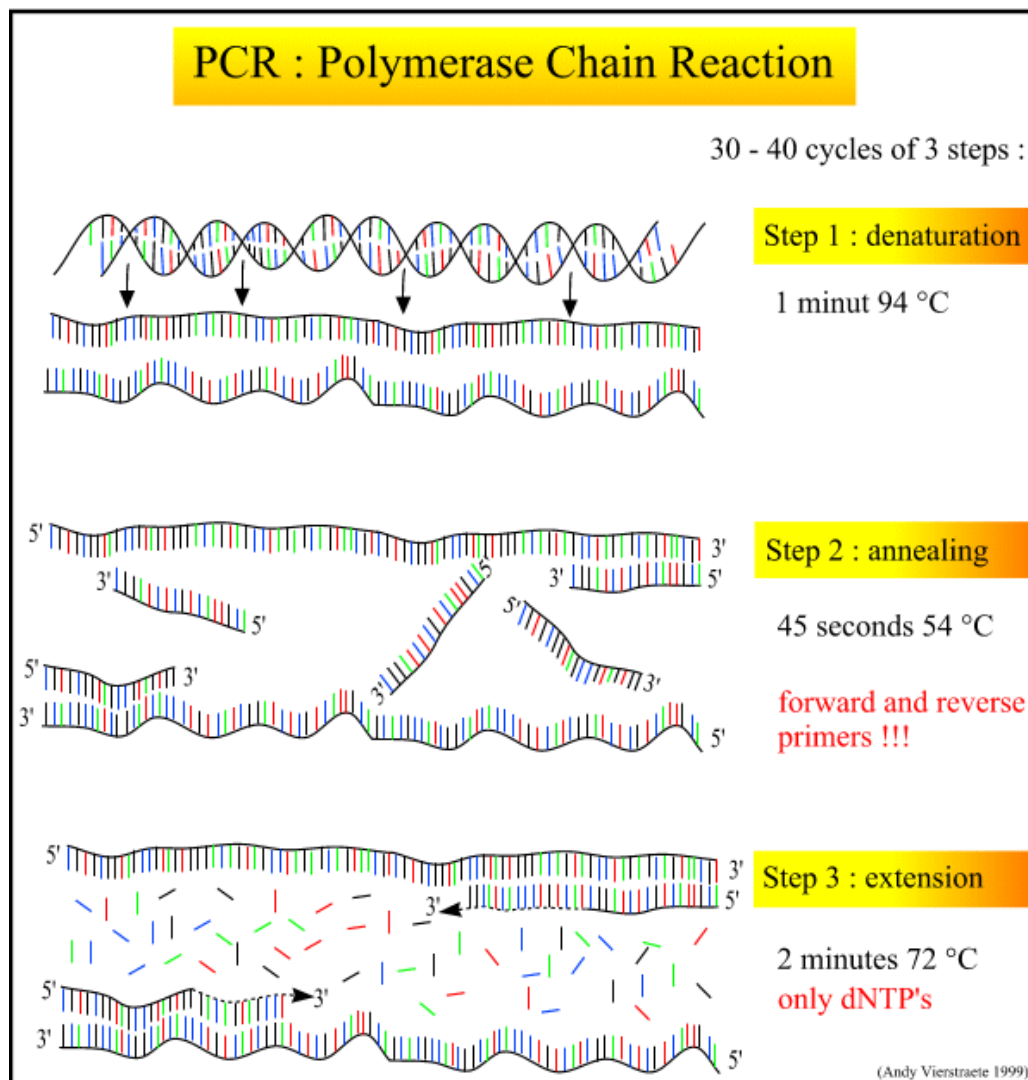


Figura 8: Esquema das três etapas cíclicas da PCR.

A genotipagem de HPV, de acordo com o PapilloCheck® desenvolvido pela Greiner Bio-One, está certificado como diagnóstico *in vitro* para identificação qualitativa específica de 24 tipos de papilomavírus humano de uma amostra cervical com sensibilidade de 98%. Com o teste podem ser identificados 6 tipos de HPV de baixo risco (tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44/55 – ele não distingue o 44 do 55), e 18 tipos de alto risco (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82) tornando possível prever o risco de carcinoma uterino para a paciente (**Figura 9**) (83).

Existem evidências consideráveis que o risco absoluto para desenvolvimento de lesões precursoras do câncer e câncer cervical varia entre os genótipos. A detecção de genótipos específicos de HPV pode ser útil para a diferenciação de risco, maior ou menor, em mulheres HPV oncogênico positivas. Além disso, a detecção de HPV oncogênico persistente fortemente prediz o desenvolvimento de câncer ou suas lesões precursoras, e o seu monitoramento pode prever a doença. Embora menos específico para rastreamento primário, pode ser adicionado ao acompanhamento citológico e ainda, orientar a avaliação de cura pós-tratamento já que possui maior reprodutibilidade dos resultados (18).

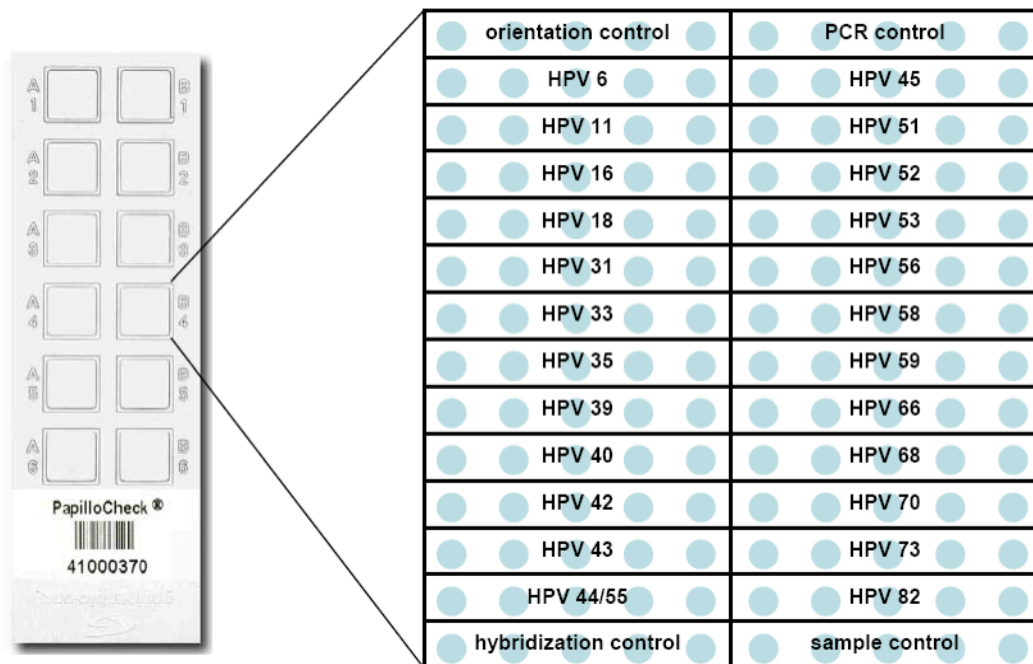


Figura 9: Chip de DNA do PapilloCheck®. Cada um dos 12 poços do chip de DNA contém um *microarray* com 28 sondas diferentes dispostas em replicatas de 5 cada uma, como se indica à direita da figura. Além das regiões de controle.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Descrever a frequência genotípica do HPV em exames de genotipagem, citologias cervicais e biópsias penianas através da análise de banco de dados de um laboratório clínico do Distrito Federal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar resultados dos exames de genotipagem para HPV, de citologia cervical e biópsias penianas e identificar:

- Positividade para HPV;
- Risco oncogênico associado ao vírus (alto risco ou baixo risco);
- Tipo de infecção (simples ou múltipla);
- Distribuição das espécies de HPV;
- Distribuição genotípica de HPV;

Além disso, correlacionar essas distribuições e frequências acima citadas fazendo uma comparação entre os sexos, entre faixas etárias (≤ 30 anos, entre 31 e 44 anos e ≥ 45 anos), entre os tipos de infecções e entre os tipos de lesões cervicais e penianas em busca de tendências de aumento ou diminuição.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANÁLISE NO BANCO DE DADOS DE RESULTADOS LABORATORIAIS

O banco de dados analisado neste estudo foi o de resultados de exames do Laboratório Sabin de Análises Clínicas de Brasília – DF. Através do *software* de gestão laboratorial “Shift” a base de dados foi pesquisada pela solicitação de estatísticas pós-calculadas. Na análise de estatística pós-calculada foram pesquisados cadastros de pacientes que realizaram o exame de genotipagem para HPV (PapilloCheck®) desde a sua implantação em fevereiro de 2009 até o mês de maio de 2011, de ambos os sexos, de todas as idades (0 a 100 anos), atendidos em todos os postos de coleta do laboratório. O sistema retornou uma lista com 4251 cadastros contendo número de identificação (ordem de serviço), nome, e idade do paciente. Esta lista foi tabulada no programa Excel, e em seguida cada ordem de serviço foi acessada manualmente para identificação e tabulação dos genótipos de HPV detectados no exame de genotipagem. Além disso, verificou também se o paciente realizou exames de citologia cervical (Papanicolaou, chamado no laboratório de colpocitologia), no caso das mulheres, e biópsia (histologia) de lesões penianas no caso dos homens. O exame de citologia cervical é realizado no próprio Laboratório Sabin, o exame de biópsia peniana é terceirizado com o Laboratório de Imunopatologia de Brasília (LIB), localizado também em Brasília. O resultado do exame citológico foi acessado diretamente no banco de dados do Laboratório Sabin, e uma cópia dos laudos da biópsia peniana foi solicitada ao laboratório conveniado LIB. Os resultados e informações relevantes dos laudos para este estudo foram também tabulados no programa Excel. No caso das mulheres, foram incluídos apenas pacientes com cadastro de genotipagem de HPV e de citologia cervical com intervalo máximo de um mês entre os dois exames, com a finalidade de garantir que a amostra analisada em um exame seja representativa da analisada no outro. Uma vez que estas podem não ser entregues simultaneamente no laboratório. Dificilmente, alterações citológicas se modificam em um intervalo de um mês, além disso, a maioria das amostras incluídas fizeram os dois exames no mesmo dia. Mesmo a maioria das infecções pelo HPV sendo transitórias, 50% são eliminadas em 8 meses e 90% em dois anos (54). No caso dos homens, decidiu-se ser mais restrito e evitar possíveis críticas com relação ao intervalo. Neste caso, foram incluídas ordens de serviço com os dois exames cujas amostras foram entregues no

mesmo dia. Em todos os casos, os pacientes que realizaram mais de uma genotipagem neste período foram contabilizados como amostras independentes.

3.2 POPULAÇÃO ESTUDADA

Neste estudo as amostras avaliadas foram de pacientes que realizaram o exame de genotipagem de HPV pela metodologia PapilloCheck® entre fevereiro de 2009 e maio de 2011 no Laboratório Sabin de Análises Clínicas localizado em Brasília, Distrito Federal (n=4251). Assim, não pode ser considerada como uma amostra representativa da população geral, mas sim a população do Distrito Federal que tem acesso ao exame de genotipagem de HPV. Entretanto, o Laboratório Sabin de Análises Clínicas tem 28 anos de atuação no Distrito Federal, é o maior laboratório clínico do Centro-Oeste, realiza um milhão de exame por mês, atende cerca de 6.000 pacientes por dia. Até 2011, o laboratório possuía 68 postos de coleta e unidades captadoras de amostras em Brasília e em todas as cidades satélites do Distrito Federal, atendendo assim boa parte da população do DF (**Figura 10**). Além disso, algumas mulheres incluídas nesse estudo eram residentes em municípios do estado de Goiás localizados nos arredores do DF. O laboratório realiza cerca de 350 genotipagens de HPV mensalmente, trata-se de um exame coberto pela maioria dos convênios médicos, pois assumiu os mesmo códigos e referências do exame de captura híbrida. De fato, 98% das genotipagem realizadas são via planos de saúde, ou seja, é um exame acessível para população que possui convênios médicos, sendo o único laboratório que realiza o exame na região desde fevereiro de 2009 (31). Assim, a amostragem deste estudo embora não possa ser considerada a população geral, existe a dúvida se ela realmente não a representa, em todo caso consideramos que a amostragem avaliada é a população do DF e entorno que têm acesso ao exame de genotipagem.

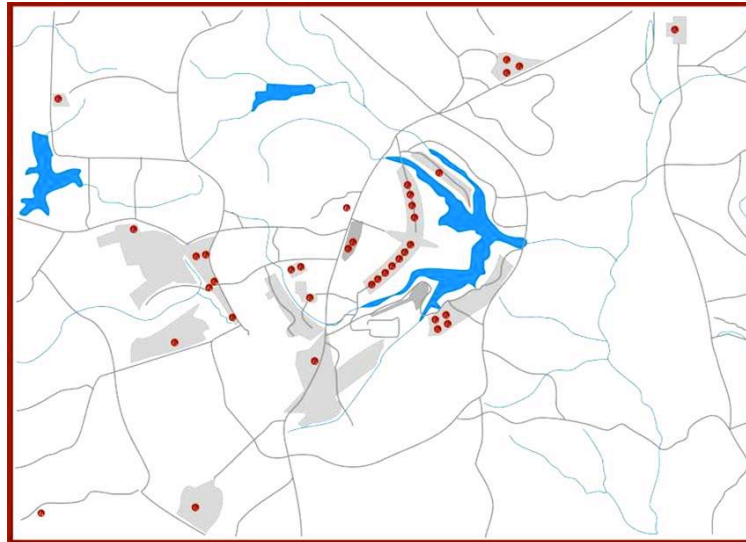


Figura 10 - Esquema representativo da localização dos postos de coleta do Laboratório Sabin de Análises Clínicas.

3.3 VARIÁVEIS CATEGÓRICAS AVALIADAS

As variáveis analisadas neste estudo foram positividade para HPV, tipo de infecção, oncogenicidade viral, distribuição genotípica, distribuição das espécies, conclusão do laudo da citologia cervical, alterações citopáticas nas biópsias penianas, conclusão do laudo da biópsia peniana. A positividade representa a percentagem de resultados positivos para o DNA do HPV no exame de genotipagem, ou seja, percentagem de amostras com resultado HPV positivo. O tipo de infecção pode ser simples ou múltipla, infecção simples é quando foi detectado um único genótipo de HPV, infecção múltipla é quando detectou mais de um genótipo de HPV. A oncogenicidade viral se relaciona ao risco oncogênico associado ao genótipo do HPV, foram considerados que os genótipos podem ser de alto ou baixo risco de acordo com a classificação indicada pelo fabricante da tecnologia PapilloCheck®, e que condiz com a classificação encontrada na literatura (45). A distribuição genotípica consiste na ocorrência de cada genótipo individualmente, neste caso cada tipo de HPV encontrado é computado como um evento independentemente se ocorreu na forma de infecção simples ou múltipla, os genótipos pesquisados pelo PapilloCheck® são 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44/55, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 e 82. Assim, um único paciente pode contribuir com mais de um genótipo para os estudos. A distribuição das espécies leva em consideração a classificação consagrada na literatura (6) e baseada na homologia do gene L1, para esta contagem, a respectiva espécie foi atribuída aos genótipos identificados na análise da distribuição genotípica. A

conclusão da citologia cervical foi identificada ao acessar os laudos dos pacientes que realizaram os exames de genotipagem de HPV e de citologia cervical com intervalo máximo de um mês entre os dois exames, os possíveis resultados são Padrão Normal (PN); Atipias em células escamosas de significado indeterminado (ASCUS); Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL); Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL). As alterações citopáticas nas biópsias penianas foram retiradas dos respectivos laudos das amostras que realizam a genotipagem de HPV e a histologia no mesmo dia. As principais alterações foram lesão exofítica, hiperqueratose, parakeratose, acantose irregular, papilomatose, hipergranulose, atipia coilocitótica, queratinização, hiperplasia e perda da polaridade basal. A conclusão do laudo da biópsia peniana foi retirada dos respectivos laudos das amostras que realizaram a genotipagem de HPV e a histologia no mesmo dia, e os possíveis resultados são alterações citológicas sugestivas de infecção pelo HPV (SHPV) e alterações citológicas não sugestivas de infecção pelo HPV (NSHPV). Assim, todas as variáveis analisadas neste trabalho são categóricas, exceto a idade, e foram expressas como frequência absoluta e relativa, e a idade foi expressa como média e desvio padrão.

3.4 DIVISÕES DO ESTUDO

3.4.1 Parte 1

Corresponde à análise da totalidade das amostras, neste caso as 4251 amostras anogenitais que realizaram o exame de genotipagem de HPV entre fevereiro de 2009 e maio de 2011 foram incluídas. Os pacientes que realizaram mais de uma genotipagem neste período foram contabilizados como amostras independentes. As variáveis analisadas foram positividade, tipo de infecção, oncogenicidade, distribuição genotípica, e distribuição das espécies. Estas foram contabilizadas e apresentadas na sua totalidade, e de acordo com o gênero (3201 mulheres e 1050 homens). Os achados foram apresentados na forma de frequência absoluta e relativa. Neste caso, as proporções entre homens e mulheres de todas as variáveis supracitadas foram comparadas pelo teste Qui-Quadrado ou teste exato de Fisher quando apropriado. Além disso, as amostras foram agrupadas nas faixas etárias ≤ 30 (n=1991), 31-44 (n=1693), e ≥ 45 (n= 567) anos para a avaliação da

influência da idade, e foram escolhidos para facilitar comparação com outros estudos (85). Assim, a positividade, tipo de infecção, oncogenicidade, distribuição genotípica, e distribuição das espécies foram contabilizadas em cada faixa etária, e novamente apresentada na forma de frequência absoluta e relativa. A tendência de aumento ou diminuição com a idade foi avaliado pelo teste Qui-Quadrado para tendência. Esta parte do estudo foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS, protocolo - 1109/10.

3.4.2 Parte 2

Corresponde à análise das amostras que realizaram o exame de genotipagem de HPV e citologia cervical com intervalo máximo de um mês entre os dois, no período de fevereiro de 2009 e maio de 2011. A maioria das amostras realizou os dois exames no mesmo dia. Os pacientes que realizaram mais de uma genotipagem neste período foram contabilizados como amostras independentes. Neste caso, 1913 amostras foram incluídas na análise. As variáveis analisadas foram positividade, tipo de infecção, oncogenicidade, distribuição genotípica, e distribuição das espécies. Estas foram contabilizadas e apresentadas na forma de frequência absoluta e relativa na sua totalidade e segundo o grau de lesão celular da citologia cervical PN 1715 (89,6%), ASCUS 131 (6,85%), LSIL 55 (2,88%) e HSIL 12 (0,63%). Neste caso, a tendência de aumento ou diminuição das variáveis com o grau de lesão celular foi avaliado pelo teste Qui-Quadrado para tendência. Além disso, as amostras foram agrupadas nas faixas etárias ≤ 30 (n= 897), 31-44 (n= 782), e ≥ 45 (n= 234) anos para a avaliação da influência da idade sobre estas mesmas variáveis. Novamente, o teste Qui-Quadrado para tendência foi utilizado. Esta parte do estudo foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS, protocolo - 1109/10.

3.4.3 Parte 3

Corresponde à análise das amostras que realizaram o exame de genotipagem de HPV e biópsia (histologia) de lesão peniana no mesmo dia, entre fevereiro de 2009 e maio de 2011. Os pacientes que realizaram mais de uma genotipagem neste período foram contabilizados como amostras independentes. Neste caso, 43 amostras foram incluídas na análise. As variáveis analisadas foram positividade, tipo de infecção, oncogenicidade, distribuição genotípica, e distribuição das espécies contabilizadas e apresentadas na forma de frequência absoluta e relativa na sua totalidade. Além disso, foi analisada a associação entre as alterações citopáticas (lesão exofítica, hiperkeratose, parakeratose, acantose irregular, papilomatose, hipergranulose, atipia colicitótica, queratinização, hiperplasia e perda da polaridade basal) encontradas na histologia e resultado sugestivo ou não de infecção por HPV relatado na conclusão dos laudos histológicos, positividade na genotipagem, tipo de infecção, e oncogenicidade viral. Neste caso, as associações foram avaliadas pelo teste exato de Fisher. Devido à pequena amostragem a influência da idade não foi avaliada. Esta parte do estudo foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Tiradentes, Aracaju/SE protocolo - 170911.

3.5 EXAME DE GENOTIPAGEM DE HPV NO LABORATÓRIO SABIN DE ANÁLISES CLÍNICAS

O exame de genotipagem de HPV é realizado na unidade de biologia molecular do Laboratório Sabin pela metodologia PapilloCheck® (Greiner Bio-One) seguindo as recomendações do fabricante. O DNA das amostras anogenitais, recebidas em tubos de captura híbrida (*cervical sampler Digene*), é purificado com o extrator automatizado de DNA EasyMag™ (Biomerieux) também de acordo com as instruções do fabricante. O PapilloCheck® é executado no DNA extraído e detecta 24 diferentes genótipos de HPV (18 tipos de alto risco e 6 tipos de baixo risco). Os tipos de HPV que podem ser detectados e diferenciados no teste são HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44/55, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 e 82. Sendo de baixo risco os HPVs 6, 11, 40, 42, 43 e 44/55. O genoma do HPV 55

compartilha 95% de homologia com o HPV 44 e, assim, constitui um subtipo do HPV 44 (6), o PapilloCheck® não diferencia este dois genótipos, para facilitar a compreensão vamos chamá-los apenas de 44. Simplificadamente, o teste consiste na amplificação de um fragmento de 350 pb do gene E1 do HPV usando um tipo de PCR multiplex com *primers* específicos. Em seguida, esses produtos de PCR são hibridizados contra um *chip* de DNA que contém sondas específicas para cada genótipo viral contemplado no teste. Para evitar resultados falso-negativos, avaliar a qualidade, e a inibição da reação de PCR são também amplificados, simultaneamente, um controle endógeno de PCR (gene ADAT1 humano), e um DNA exógeno sintético (controle de PCR). Ambos devem gerar resultados positivos, caso contrário, a reação é invalidada. Todas as sequências amplificadas no teste utilizam *primers* marcados com CY5 (fluorescência vermelha). Além disso, o próprio *chip* contém uma segunda bateria de controles para avaliar o processo de hibridização (controles de hibridização e controle de orientação) que são sequências de DNA sintéticas e marcadas com CY3 (fluorescência verde). Após a hibridização e lavagens, a leitura do *chip* é feita no CheckScanner™ (Greiner Bio-One) que avalia os sinais de fluorescências CY3 e CY5 sobre os pontos de hibridização que, em seguida, são automaticamente interpretados pelo *software* CheckReport™ (Greiner Bio-One). Os resultados liberados são positivo ou negativo para cada genótipo contemplado no teste (86).

3.6 EXAME CITOLÓGICO CÉRVICO-VAGINAL (COLPOCITOLOGIA).

O exame citológico é realizado pela técnica de coloração de Papanicolaou, e o laudo está em conformidade com a padronização estabelecida pela Sociedade Brasileira de Citologia e consenso Bethesda 2001. Nos laudos as seguintes variáveis estão descritas: local da coleta, tipo de material, aspecto do esfregaço, grau de descamação celular, tipos de células identificadas, aspectos celulares evidenciados, além disso, é feito o estudo microbiológico e avaliação citohormonal. O indicador mais relevante para este projeto são as conclusões dos laudos sobre o grau de alteração celular evidenciados, cujos resultados possíveis são os que foram anteriormente detalhados: Padrão Normal (PN); Atipias em células escamosas de significado indeterminado (ASCUS); Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL); Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL). Um quinto resultado era

possível “Padrão citológico inflamatório”, o qual foi agrupado aos laudos com resultados “Padrão Normal”, pois também não representam lesões celulares características de infecção pelo HPV. A amostragem de lesão cervical deste estudo é PN 1715 (89,6%), ASCUS 131 (6,85%), LSIL 55 (2,88%) e HSIL 12 (0,63%). O grupo PN é composto por, 556 que foram classificados como “Dentro dos limites da normalidade” e 1159 como “Padrão citológico inflamatório”.

3.7 EXAME DE BIÓPSIA PENIANA

O exame anatomopatológico de biópsia peniana é encaminhado para o “Laboratório de Imunopatologia de Brasília (LIB)”. Nos laudos estão descritos o material enviado, a descrição macroscópica da biópsia, a descrição das observações microscópicas e conclusão. Além da conclusão do laudo, incluindo se as atipias citológicas são sugestivas de infecção viral (SHPV – sugestivas de infecção por HPV e NSHPV – não sugestivas de infecção por HPV). Neste estudo, as alterações microscópicas avaliadas foram: lesão exofítica, hiperkeratose, parakeratose, acantose irregular, papilomatose, hipergranulose, atipia coloitótica, queratinização, hiperplasia e perda da polaridade basal. As conclusões dos laudos das 43 amostras incluídas nesta etapa dos estudo foram:

- Para os resultados SHPV (n=28): Hiperplasia epitelial (n=14, 50%); Hiperplasia epitelial papilomatosa (n=8, 28,5%) e Condiloma acuminado (n=6, 21,5%).
- Para os resultados NSHPV (n=15): Ceratose seborréica (n=3, 20%); Doença bolhosa intradérmica (n=1, 6,6%); Líquen escleroso (Balanite xerótica) (n=1, 6,6%); Nevo melanocítico intradérmico (n=1, 6,6%); Molusco contagioso (n=1, 6,6%); Eritroplasia de queyrat (n=1, 6,6%); Pele sem alterações diagnósticas (n=2, 13,5%); Sugestivo de fibroma mole (n=1, 6,6%); Nevo melanocítico juncional (n=1, 6,6%) e Hiperplasia epitelial escamosa (n=3, 20%).

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os testes estatísticos utilizados neste trabalho foram os testes de hipótese para dados categóricos convencionais: o teste Qui-Quadrado, o teste Qui-Quadrado para tendência e o teste exato de Fisher. Estas análises foram realizadas utilizando

o aplicativo GraphPad Prism 5.0, que contempla os três testes. Resumidamente, o teste Qui-Quadrado foi utilizado para testar a independência (associação), ou seja, se duas variáveis categóricas são dependentes uma da outra, por exemplo, se o resultado positivo para genotipagem de HPV é dependente de um resultado positivo para exame de citologia cervical, ou histologia de lesão peniana. Ou, testar a homogeneidade, se a proporção de certa característica é a mesma em dois ou mais subgrupos, por exemplo, se a proporção de resultados positivos para o HPV ou de infecções múltiplas é a mesma entre homens e mulheres. Como a validade do teste Qui-Quadrado se torna questionável quando em pequenas amostras, nas situações onde as análises de associação e homogeneidade não obedeciam os critérios de Cochran para uso do Qui-Quadrado “Todos os valores esperados para as células da tabela de contingência forem maior do que 1, e até 20% das células tenha valor esperado menor do que 5”, o teste utilizado foi o exato de Fisher. O teste exato de Fisher, como seu próprio nome diz, sempre dá um valor de p “exato” e funciona bem com amostras pequenas. A maioria dos livros de estatística aconselham a usá-lo em vez de Qui-Quadrado, pois o valor de p do teste Qui-Quadrado é apenas uma aproximação. Com grandes amostras, o teste Qui-Quadrado funciona muito bem, gerando o mesmo resultado que o teste de Fisher. Com amostragens pequenas, o Qui-Quadrado não é exato. Algumas das avaliações deste trabalho envolviam amostragem pequenas como associação entre alterações citopáticas e a presença do DNA do HPV nas lesões penianas (Parte 3). O programa GraphPad Prism 5.0 considera a amostragem avaliada e define automaticamente se deve utilizar o teste exato de Fisher ou Qui-Quadrado (87).

O teste Qui-Quadrado para tendência foi utilizado quando se desejava avaliar mais de duas proporções, e se uma das variáveis pudesse ser organizada em sua ordem natural. Ou seja, avaliar se uma característica aumenta ou diminui de acordo com a ordem inerente da outra, por exemplo, a positividade para o HPV aumenta ou diminui com o aumento da idade. Nestas situações, o teste Qui-Quadrado para tendência tende a ser mais sensível e poderoso que o teste Qui-Quadrado convencional na detecção de associações. Em todos os casos, as comparações foram consideradas estatisticamente significante se $p \leq 0,05$. (88).

4 RESULTADOS

4.1 PARTE 1

4.1.1 Análise total do banco de dados

A pesquisa por solicitação de estatísticas pós-calculada no *software* de gestão laboratorial “Shift”, gerou uma lista com 4251 cadastros de pacientes que realizaram o exame de genotipagem para HPV no período de fevereiro de 2009 e maio de 2011. Dentre estas, 3201 (75,3%) eram de indivíduos do sexo feminino e 1050 (24,7%) de indivíduos do sexo masculino. A média (desvio padrão) de idade dos pacientes foi 33,8 (\pm 10,3) anos. No sexo feminino, média de idade observada foi 32,8 (\pm 9,5) anos, e no sexo masculino 33,7 (\pm 10,3) anos. Das 4251 ordens de serviço incluídas neste estudo, 1882 (44,3%) apresentaram resultado positivo, e 2369 (55,7%) negativo para genotipagem de HPV. Nas amostras do sexo feminino, 1286 (40,2%) eram positivas e 1915 (59,8%) negativas. Nas do sexo masculino, 596 (56,8%) positivas e 454 (43,2%) negativas (**Figura 11**). Assim, a positividade geral do HPV neste estudo é de 44,3%. E os homens apresentaram proporção de resultados positivos significativamente maior que as mulheres (56,8% *versus* 40,2%, $p < 0,0001$).

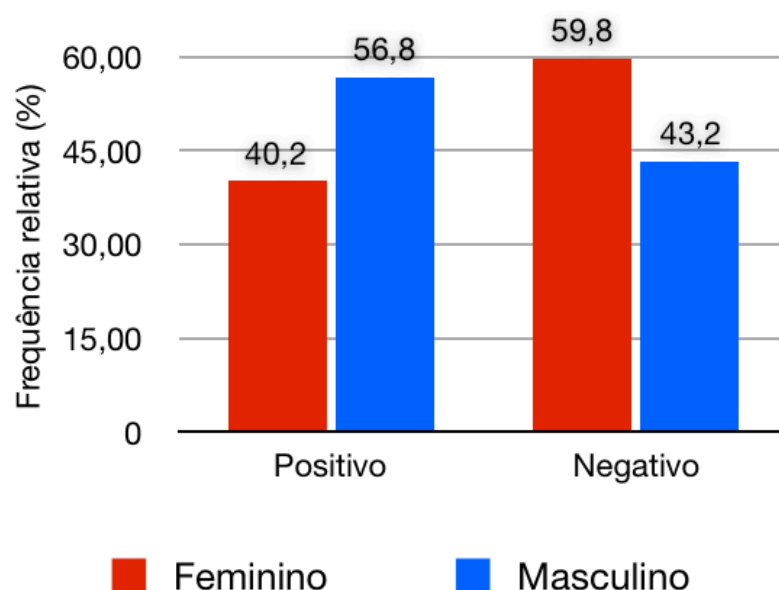


Figura 11 - Positividade no exame de genotipagem de HPV. Resultados positivos e negativos na genotipagem do HPV de acordo com o exame PapilloCheck®. Nos homens (barras azuis), a positividade observada foi de 56,8% e nas mulheres (barras vermelhas) 40,2%, ($p < 0,0001$). Houve diferença significativa entre estas proporções.

Em seguida, avaliou-se o tipo de infecção. Das 1882 amostras positivas, 993 (52,8%) eram infecções simples, e 889 (47,2%) infecções múltiplas. Nas mulheres, das 1286 amostras positivas, 725 (56,4%) eram infecções simples e 561 (43,6%) infecções múltiplas. Por outro lado, das 596 amostras positivas nos homens, 268 (45%) eram infecções simples e 328 (55%) infecções múltiplas (**Figura 12**). Assim, infecções múltiplas foram encontradas em aproximadamente metade dos exames positivos (47,2%), e foram mais frequentes nos homens do que nas mulheres (55% *versus* 43,6%, $p < 0,0001$).

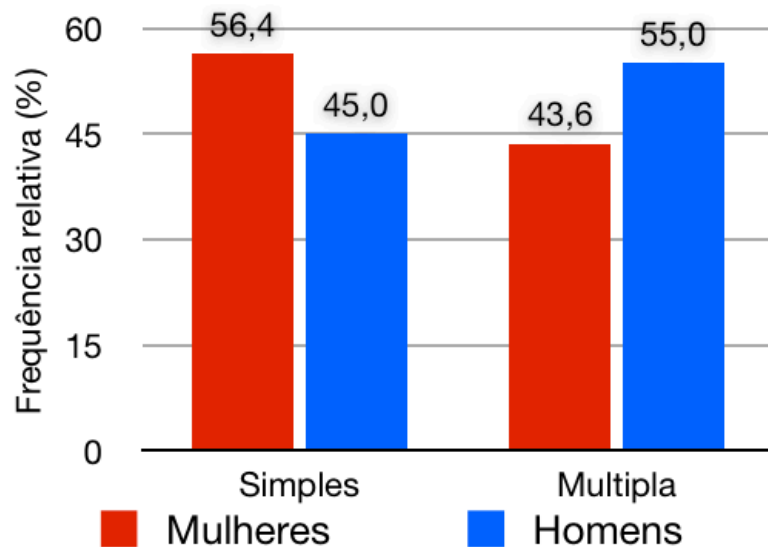


Figura 12 – Proporção dos tipos de infecção em homens e mulheres. Proporção de infecções múltiplas e simples nas mulheres (barras vermelhas) e nos homens (barra azuis). Homens apresentam significativamente mais infecção múltipla que as mulheres (55% *versus* 43,6%, $p < 0,0001$).

Na avaliação do risco oncogênico cada genótipo identificado no exame de genotipagem foi contabilizado como uma ocorrência, independentemente se em infecção múltipla ou simples. Ou seja, 3539 genótipos foram encontrados nas 1882 amostras positivas. Assim, observou-se que destes 3539 genótipos, 2485 (70,22%) eram de alto risco e 1054 (29,78%) de baixo risco. Ademais, quando distribuídos de acordo com o sexo do paciente, observou-se que as mulheres apresentaram uma proporção maior de genótipos de alto risco que os homens, 1756 (77,02%) *versus*

729 (57,9%), $p < 0,0001$. Ou seja, os homens 530 (42,1%) apresentaram mais genótipos de baixo risco que as mulheres 524 (22,98%), $p < 0,0001$ (**Figura 13**).

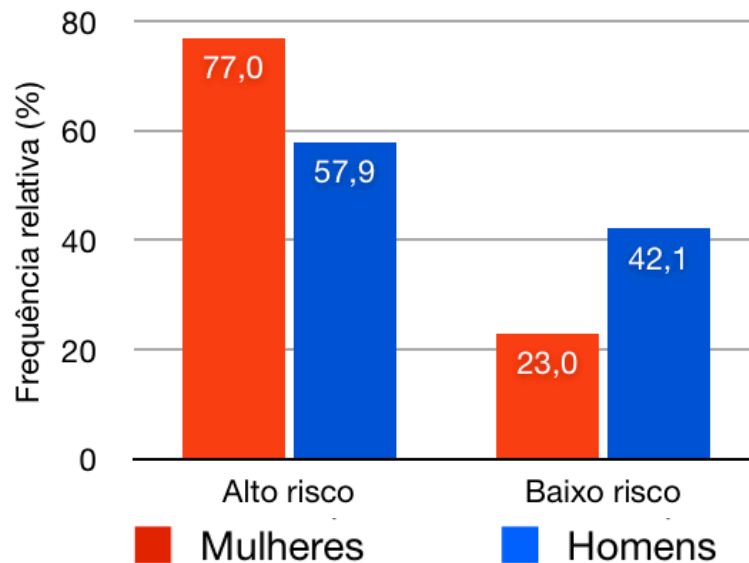


Figura 13 - Risco atribuído aos genótipos em homens e mulheres. Proporção de genótipos de alto e baixo risco nas mulheres (barras vermelhas) e nos homens (barras azuis). Mulheres possuem significativamente mais genótipos de alto risco que os homens 77,02% versus 57,9%, $p < 0,0001$. Ou seja, os homens apresentam mais genótipos de baixo risco que as mulheres.

Em seguida, analisou-se a distribuição genotípica do HPV nas amostras positivas deste estudo. Como na análise da oncogenicidade, cada genótipo identificado no exame de genotipagem foi contabilizado como uma ocorrência, independentemente se em infecção múltipla ou simples. Na **Figura 14**, pode-se observar a distribuição genotípica dos 24 diferentes tipos de HPV pesquisados pelo PapilloCheck®. A distribuição genotípica encontrada em ordem decrescente foi 16, 56, 6, 44, 42, 53, 66, 68, 51, 39, 11 e 52, 31, 59, 58, 40, 73, 43 e 70, 18 e 82, 45, 35, 33. Dentre os 5 genótipos mais frequentes dois são de alto risco (16 e 56) e três de baixo risco (6, 44, e 42). Em seguida, os genótipos foram agrupados em espécies de HPV segundo a classificação de *de Villiers et al, 2004*. As espécies mais prevalentes foram A9 e A6, composta apenas por HPV de alto risco (16, 31, 33, 35, 52, 58) e (53, 56, 66), respectivamente, seguidas da espécies A7, A10, A5, A1, A8 e A11 (**Figura 15**).

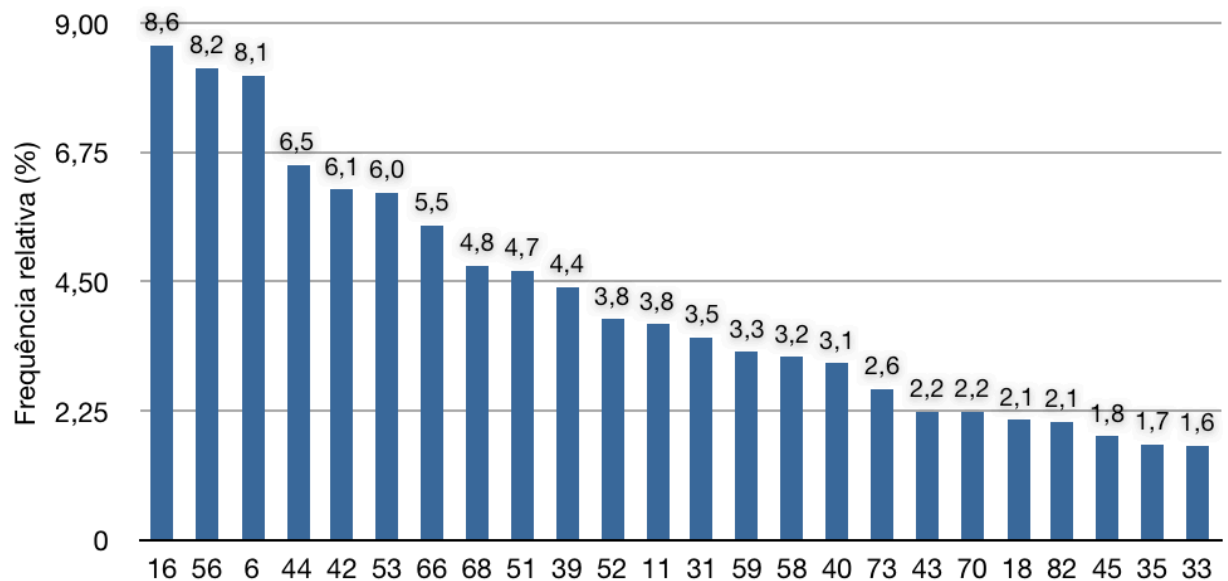


Figura 14 - Distribuição genótipica do HPV nas amostras positivas segundo o PapilloCheck®. Frequência observada de cada um dos 24 genótipos pesquisados pelo exame. Cada genótipo identificado foi contabilizado como uma ocorrência independentemente do tipo de infecção simples ou múltipla. Neste caso, 3539 genótipos foram encontrados em 1882 amostras positivas, e genótipos de baixo risco são representados pelos 6, 11, 40, 42, 43, e 44.

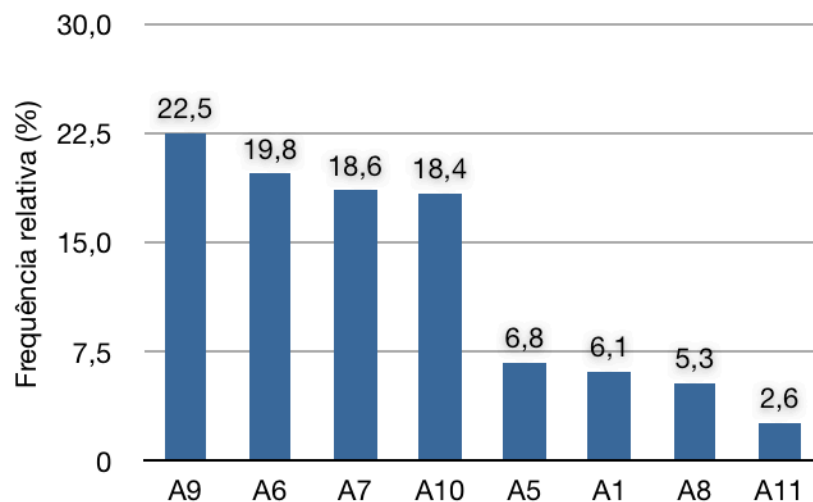


Figura 15 - Distribuição das espécies de HPV nas amostras positivas segundo o PapilloCheck®. Cada genótipo agrupado na respectiva espécie segundo a classificação de *de Villiers et al., 2004* (6), que utiliza homologia na região L1 do genoma do vírus. Neste caso, 3539 genótipos foram encontrados em 1882 amostras positivas.

Na tentativa de se observar diferenças na distribuição genótipica entre homens e mulheres os genótipos encontrados foram distribuídos de acordo com o sexo do paciente. A distribuição genótipica observada está representada na **Figura**

16. Algumas diferenças importantes foram encontradas como por exemplo os genótipo de baixo risco 6, 11, 40, 42, 43 e 44, são mais prevalentes nos homens do que nas mulheres. E alguns genótipos de alto risco, como 16, 31, 33, 52, 53, 56, 68, e 70, são mais prevalentes nas mulheres do que nos homens.

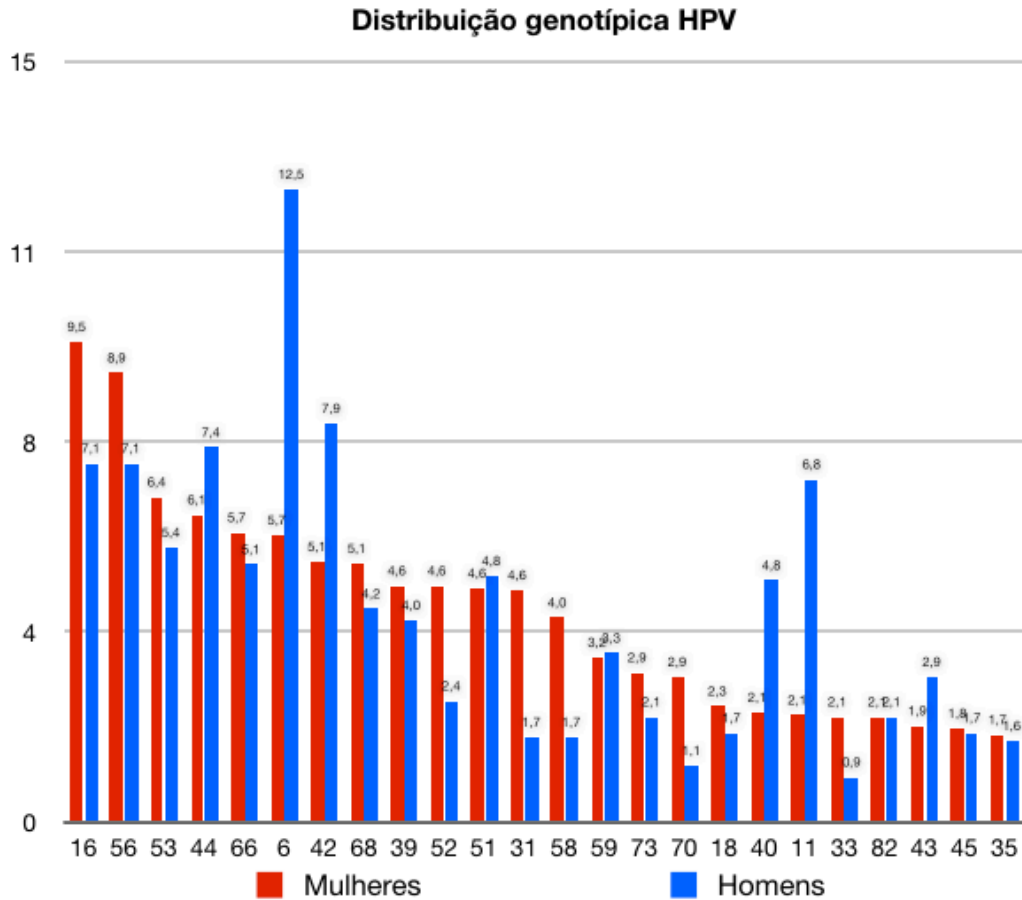


Figura 16 - Distribuição genotípica do HPV em homens e mulheres. Frequência relativa dos genótipos pesquisados pelo PapilloCheck® nas mulheres (barras vermelhas), e nos homens (barras azuis). Os genótipos de baixo risco como 6, 11, 40, 42, 43 e 44, são mais prevalentes nos homens e os genótipos de alto risco 16, 31, 33, 52, 53, 56, 68, e 70 são mais prevalentes nas mulheres. As percentagens em cada gênero foram calculadas a partir do respectivo número total de genótipos. Neste caso, 2280 genótipos foram encontrados em 1286 amostras positivas nas mulheres, e 1259 genótipos foram encontrados nas 596 amostras positivas nos homens. Cada genótipo identificado foi contabilizado como uma ocorrência independentemente do tipo de infecção simples ou múltipla.

Na próxima análise o mesmo foi feito com as espécies de HPV. Como pode ser observado na **Figura 17**, as espécies mais frequentes nas mulheres em ordem decrescente foram A9, A6, A7, A10, A5, A1, A8, e A11. Nos homens, as espécies mais frequentes em ordem decrescente são A10, A6, A9, A1, A8, A5, e A11. As frequências observadas em cada gênero diferem significativamente ($p < 0,0001$). Novamente, algumas diferenças importantes foram observadas entre os sexos: as

espécies A9 ($p < 0,0001$), A6 ($p = 0,01$), A7 ($p = 0,0058$), A11 ($p = 0,14$) são mais frequentes nas mulheres que nos homens e as espécies A10 ($p < 0,0001$), A5 ($p = 0,06$), A1 ($p = 0,0015$), e A8 ($p < 0,0001$) mais frequente nos homens do que nas mulheres.

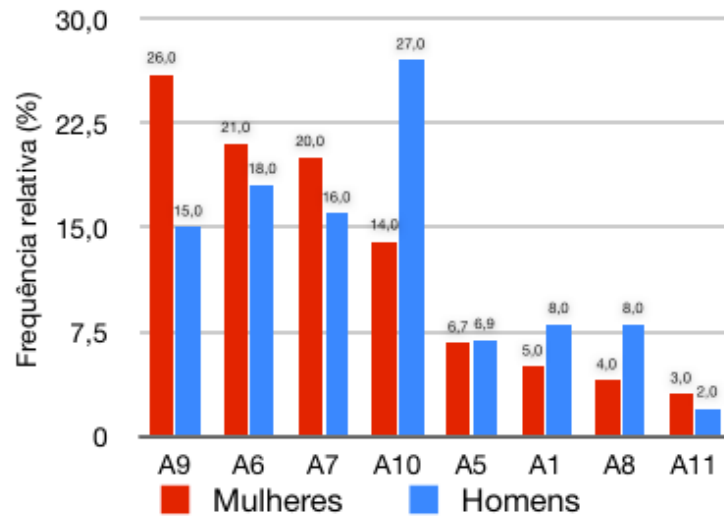


Figura 17 - Distribuição das espécies de HPV em homens e mulheres. Frequência relativa das espécies de HPV pesquisados pelo PapilloCheck® nas mulheres (barras vermelhas), e nos homens (barras azuis). As espécies em ordem decrescente de frequência nas mulheres foram A9, A6, A7, A10, A5, A1, A8, A11, e A10, A6, A9, A1, A8, A5, A11 nos homens. Todas as diferenças observadas são significativas (vide texto). Cada genótipo foi agrupado na respectiva espécie segundo a classificação de *de Villiers et al.*, 2004 (6), que utiliza homologia na região L1 do genoma do vírus. Neste caso, $n=2280$ para mulheres e $n=1259$ para os homens.

A idade e o gênero, por consequência, o comportamento sexual influenciam diretamente a infecção pelo HPV (1). Neste sentido, os homens e mulheres deste estudo foram agrupados em três faixa etárias, menor ou igual 30 anos, entre 31 e 44 anos, e maior ou igual a 45 anos. No total, 1991 (46,84%), 1693 (39,83%), 567 (13,3%) amostras foram incluídas nas faixas etárias ≤ 30 , 31-44, e ≥ 45 anos, respectivamente. Como a análise envolvia a influência do gênero, este total de amostras foi subdivido de acordo com o sexo, e por conseguinte, 1507 (47,08%), 1299 (40,6%), e 395 (12,34%) mulheres; 484 (46,1%), 394 (37,52%), e 172 (16,38%) homens, foram incluídos nas faixas etárias ≤ 30 , 31-44, e ≥ 45 anos, respectivamente. Primeiramente, as seguintes variáveis foram analisadas: positividade, infecções simples, infecções múltiplas, genótipos de alto risco e de baixo risco, tanto nas infecções simples quanto nas infecções múltiplas. Do total das amostras incluídas em cada faixa etária, ≤ 30 , 31-44, e ≥ 45 anos, a positividade foi 1049 (52,7%), 653

(38,6%), e 180 (31,75%), respectivamente. Ou seja, a proporção de resultados positivos diminuía com a idade [p(trend)<0,0001]. Além disso, observou-se que a positividade foi maior nos homens do que nas mulheres em todas as faixa etárias; ≤30 anos [309 (63,8%) *versus* 740 (49,1%), p<0,0001], entre 31-44 anos [213 (54,1%) *versus* 440 (33,9%), p<0,0001], e ≥45 anos [74 (43,0%) *versus* 106 (26,8%), p=0,0001]. Ademais, a positividade diminuía com o aumento da idade em ambos os sexos [p(trend)<0,0001 para homens e p(trend)<0,0001 para mulheres] (**Figura 18**).

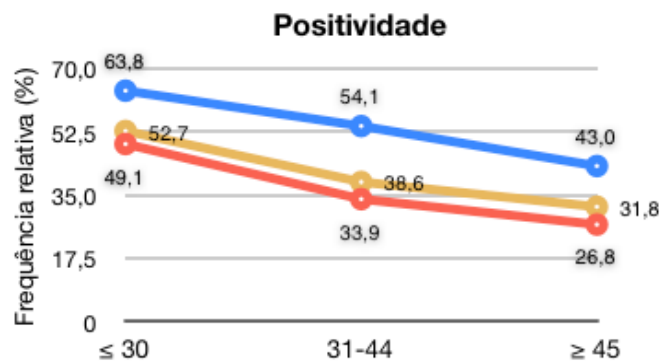


Figura 18 - Positividade para HPV total, em homens e mulheres de acordo com as faixa etárias ≤30, 31-44, e ≥45 anos. Análise da positividade, total (linha amarela), nos homens (linha azul), e nas mulheres (linha vermelha) nas faixas etárias ≤30, 31-44, e ≥45 anos. Os homens apresentam mais resultados positivos que as mulheres nas três faixas etárias, a positividade diminui com o aumento da idade em ambos os sexos, e também no total das amostras p(trend)<0,0001.

Neste mesmo sentido, analisou-se também a proporção de infecção simples e infecção múltipla. No total, as infecções simples nas faixas etárias ≤30, 31-44, e ≥45 anos foi 483 (46%), 389 (59,6%), 121 (67,2%), e múltiplas 566 (54%), 264 (40,4%), 59 (32,8%), respectivamente. Ou seja, a proporção de infecções simples aumentava, enquanto as múltiplas diminuía com a idade [p(trend)<0,0001]. O mesmo resultado foi observado em ambos os sexos quando avaliados individualmente, a proporção de infecções simples aumenta com idade enquanto que as infecções múltiplas diminuem [p(trend)<0,0001 para homens e p(trend)<0,0001 para mulheres]. Observou-se também que as mulheres têm mais infecções simples que os homens em todas as faixas etárias. Entretanto, as proporções diferiram significativamente nas faixas etárias ≤30, e 31-44 anos, mas não na faixa etária ≥45 anos; ≤30 [372 (50,3%) *versus* 111 (35,9%), p<0,0001], 31-44 [280 (63,6%) *versus* 109 (51,2%), p=0,0029], e ≥45 anos [73 (68,9%) *versus* 48 (64,9%), p=0,62] (**Figura 19**).

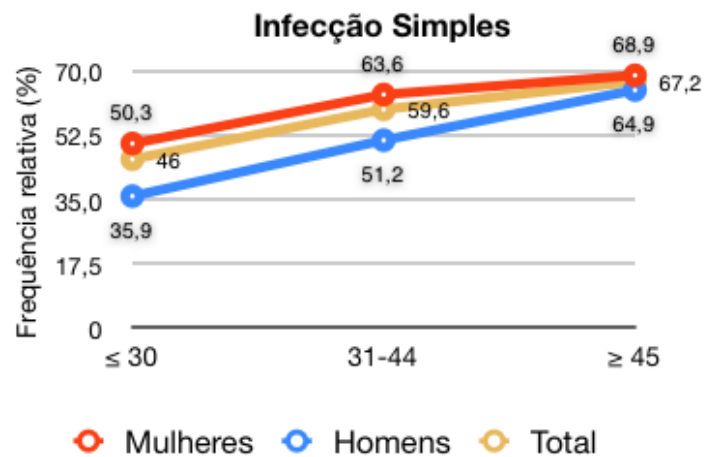


Figura 19 – Proporção de infecções simples total, em homens e mulheres de acordo com as faixas etárias ≤30, 31-44, e ≥45 anos. Proporção de infecções simples total (linha amarela), nos homens (linha azul), e nas mulheres (linha vermelha) nas faixas etárias ≤30, 31-44, e ≥45 anos. As mulheres possuem mais infecções simples que os homens nas três faixas etárias, ≤30 anos ($p < 0,0001$), 31-44 anos ($p = 0,00029$), e ≥45 anos ($p = 0,62$), e a proporção de infecção simples aumenta com o aumento da idade $p(\text{trend}) < 0,0001$.

Com relação às infecções múltiplas deve-se considerar o raciocínio contrário ao descrito para infecções simples, uma vez que nos cálculos das proporções e nas análises estatísticas foram comparados infecções simples *versus* infecções múltiplas. Ou seja, os homens tem mais infecções múltiplas que as mulheres em todas as faixas etárias, e as proporções observadas diferem significativamente nas faixas etárias ≤30, e 31-44 anos, mas não na faixa etária ≥45 anos.

Em seguida, analisou-se a oncogenicidade dos genótipos em homens e mulheres, nas faixas etárias ≤30, 31-44, e ≥45. A oncogenicidade para desenvolvimento de câncer do colo do útero considerada, alto ou baixo risco, foi a fornecida pelo fabricante do exame PapilloCheck®, que condiz com a literatura (45). Na **Figura 20**, podemos observar que a proporção de genótipos de alto risco se mantém relativamente constante com a idade 1481 (70,6%), 807 (70,7%), e 197 (65,9%) [$p(\text{trend}) = 0,25$], na totalidade das amostras e em ambos os sexo, 1087 (77,8%), 559 (77,4%), e 110 (68,8%) [$p(\text{trend}) = 0,06$] para as mulheres e 394 (56,2%), 248 (59,2%), e 87 (62,6%) [$p(\text{trend}) = 0,12$] para os homens. Ademais, as mulheres têm mais genótipos de alto risco que homens nas três faixas etárias consideradas. Entretanto, esta diferença foi significativa somente para os mais jovens e os de meia idade, pois as frequências observadas para a faixa etária ≤30 foi 1087 (77,8%) *versus* 394 (56,2%), $p < 0,0001$; para a faixa etária 31-44, 559

(77,4%) versus 248 (59,2%), $p < 0,0001$; e para a faixa etária ≥ 45 anos, 110 (68,8%) versus 87 (62,6%), $p = 0,27$.

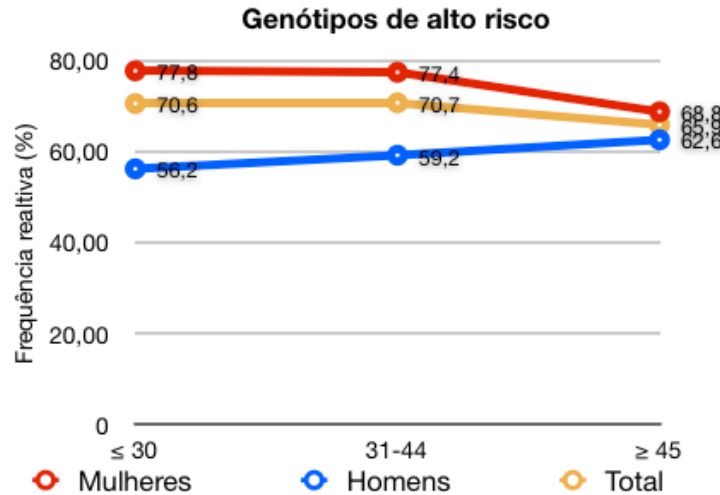


Figura 20 – Proporção de genótipos de alto risco total, em homens e mulheres de acordo com as faixas etárias ≤ 30 , 31-44, e ≥ 45 anos. Proporção de genótipos de alto risco no total (linha amarela), nos homens (linha azul), e nas mulheres (linha vermelha) nas faixas etárias ≤ 30 , 31-44, e ≥ 45 anos. As mulheres possuem mais genótipos de alto risco que os homens nas três faixas etárias, ≤ 30 anos ($p < 0,0001$), 31-44 anos ($p < 0,0001$), e ≥ 45 anos ($p = 0,27$), e a proporção deste tipo de genótipo não sofre influência da idade.

Com relação às espécies foi observado que suas frequências relativas se mantêm constante com a idade em todas as amostras, nos homens, e nas mulheres, exceto a espécie A10, dos tipos 6, 11, e 44, que aumentam sua frequência com a idade ≤ 30 [369(18,0%)]; 31-44 [204(18,0%)]; e ≥ 45 [77(26,0%)], [$p(\text{trend}) = 0,0069$], sendo que as mulheres foram as responsáveis por este aumento ≤ 30 [168(12,0%)]; 31-44 [105(15,0%)]; e ≥ 45 [42(26,0%)], [$p(\text{trend}) < 0,0001$]. No entanto, nos homens a frequência da espécie A10 permanece constante com a idade ≤ 30 [201(29%)]; 31-44 [99(24%)]; e ≥ 45 [35(25%)], [$p(\text{trend}) = 0,12$]. Assim, a frequência relativa apenas da espécie A10 varia com a idade e somente nas mulheres (**Figura 21**).

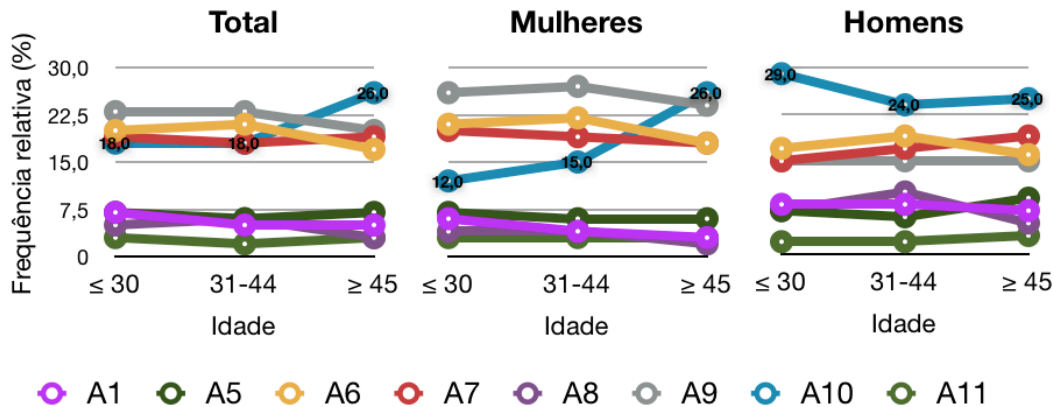


Figura 21 - Frequência relativa das espécies de HPV no total, em mulheres e homens de acordo com as faixas etárias ≤30, 31-44, e ≥45 anos. A frequência das espécies tende a se manter constante com o aumento da idade, existindo algumas diferenças nas proporções entre homens e mulheres. E a principal variação observada foi da espécie A10 no total $p(\text{trend})=0,0069$, nas mulheres $p(\text{trend})<0,0001$ e nos homens $p(\text{trend})=0,12$.

Finalmente, analisou-se a variação da ocorrência dos genótipos com a idade. Neste sentido, a frequência absoluta de cada tipo de HPV foi comparada com a soma das frequências dos demais tipos pesquisados pelo PapilloCheck® e a tendência em aumentar ou diminuir com a idade avaliada. Observou-se que a ocorrência dos genótipos 31 e 39, diminuíam; e 44 e 45 aumentavam com a idade no total das amostras. Quando a frequência de ocorrência foi analisada separadamente nos homens e nas mulheres, nos homens nenhuma tendência de variação com idade foi observada (dados não mostrados). Por outro lado, nas mulheres os genótipos 31, 39, e 42 diminuíam com o aumento da idade; e 44 e 45 aumentavam (**Tabela 4**). Assim, alguns genótipos variam significativamente com a idade e as variações mais significativas foram do genótipo de baixo risco 44 [$p(\text{trend})<0,0001$] e do genótipo de alto risco 39 [$p(\text{trend})=0,009$], e as mulheres são as responsáveis pela variação com a idade observada no total das amostras.

Tabela 4 - Genótipos de HPV que variam significativamente com a idade.

Genótipo	Total			p trend	Tendência
	≤ 30 n (%)	31-44 n (%)	≥ 45 n (%)		
31	85 (4,05)	35 (3,07)	5 (1,67)	0,02	↓
39	109 (5,19)	38 (3,33)	9 (3,01)	0,009	↓
44	109 (5,19)	87 (7,62)	35 (11,71)	<0,0001	↑
45	28 (1,33)	30 (2,63)	6 (2,01)	0,03	↑

Total					
Feminino					
Genótipo	≤ 30 n(%)	31-44 n(%)	≥ 45 n(%)	p trend	
31	72 (5,15)	29 (4,02)	3 (1,88)	0,04	↓
39	83 (5,94)	21 (2,91)	2 (1,25)	0,0002	↓
42	82 (5,87)	30 (4,16)	5 (3,13)	0,04	↓
44	61 (4,36)	54 (7,48)	23 (14,38)	<0,0001	↑
45	18 (1,29)	19 (2,63)	5 (3,13)	0,01	↑

4.2 PARTE 2

4.2.1 Análise no banco de dados de amostras que realizaram genotipagem de HPV e citologia de raspado cervical.

A segunda parte deste estudo consistiu na análise do banco de dados laboratorial em busca de ordens de serviço que realizaram a genotipagem de HPV e exame de citologia cervical com um intervalo máximo de um mês entre os exames, como discutido anteriormente nos materiais e métodos. Assim, 1913 amostras foram incluídas, dentre estas 1179 (61,83%) tinham resultado negativo, e 734 (38,27%) resultado positivo para genotipagem do HPV. A média (desvio padrão) de idade dos pacientes foi 30,2 (\pm 9,8) anos. A positividade entre as mulheres que realizaram os dois exames foi de 38,37%. Em relação à citologia cervical, 1715 (89,65%) apresentaram padrão normal (PN), sendo que destas, 584 (34,05%) eram positivas e 1131 (65,95%) negativas para o DNA do HPV na genotipagem; 131 (6,85%) apresentaram resultado ASCUS, sendo que destas, 87 (66,41%) eram positivas e 44 (33,59%) negativas para o DNA do HPV na genotipagem; 55 (2,88%) apresentaram resultado LSIL, sendo que destas, 51 (92,73%) eram positivas e 4 (7,27%) negativas para o DNA do HPV na genotipagem; 12 (0,63%) apresentaram resultado HSIL, sendo que destas, 12 (100%) eram positivas e 0 (0%) negativas para o DNA do HPV na genotipagem. Assim, a positividade para o HPV aumentou de forma diretamente proporcional ao aumento do grau de lesão celular observado na citologia, 34,05%, 66,41%, 92,73%, e 100% para PN, ASCUS, LSIL e HSIL, respectivamente [p(trend)<0,0001] (**Figura 22**).

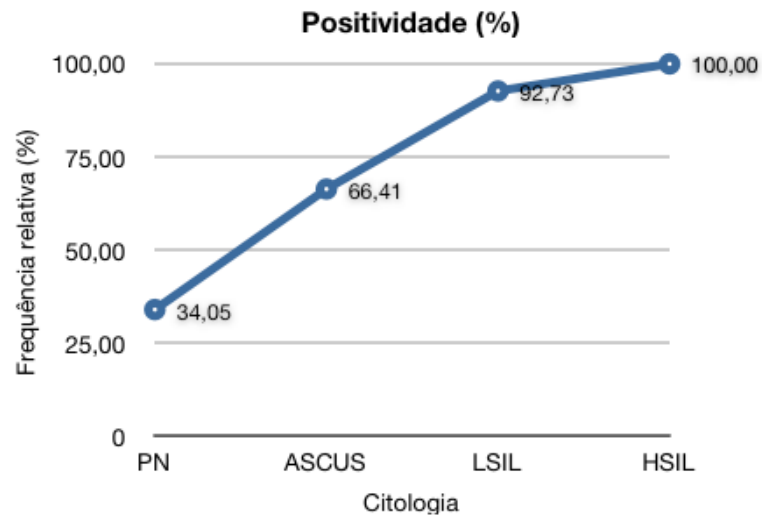


Figura 22 - Frequência relativa da positividade para genotipagem do HPV segundo o grau de lesão celular no exame citológico (colpocitologia). A positividade aumenta com a gravidade da lesão [p(trend)<0,0001]. Padrão Normal (PN), Atipia em células escamosas de significado infeterminado (ASCUS), Lesão escamosa intraepitelial de baixo grau (LSIL), Lesão escamosa intraepitelial de alto grau (HSIL).

Em seguida, avaliou-se a frequência de infecções simples e múltiplas nos diferentes resultados citológicos. Das 734 amostras positivas, 430 (58,5%) eram infecções simples. Dos 584 resultados HPV DNA positivos com citologia PN, 350 (59,93%) tinham infecção simples e 234 (40,07%) infecção múltipla; Dos 87 ASCUS HPV positivos, 43 (49,43%) tinham infecção simples e 44 (50,57%) infecção múltipla; Dos 51 LSIL HPV positivos, 28 (54,90%) tinham infecção simples e 23 (45,10%) infecção múltipla; Dos 12 HSIL HPV positivos, 9 (75%) tinham infecção simples e 3 (25%) infecção múltipla. Assim, a proporção de infecções simples e múltiplas é variável nos diferentes graus de lesão celular. As infecções simples representaram 59,93%, 49,43%, 54,90%, e 75% para PN, ASCUS, LSIL e HSIL, respectivamente [p(trend)=0,51] (**Figura 23**). Os resultados ASCUS e LSIL apresentaram menor proporção de infecção simples (maior proporção de infecções múltiplas) que o padrão normal. E observa-se uma discreta tendência de aumento das infecções simples a partir de resultado ASCUS até HSIL [p(trend)=0,12], sendo que as lesões de alto grau foram as que apresentaram maior proporção de infecção simples.

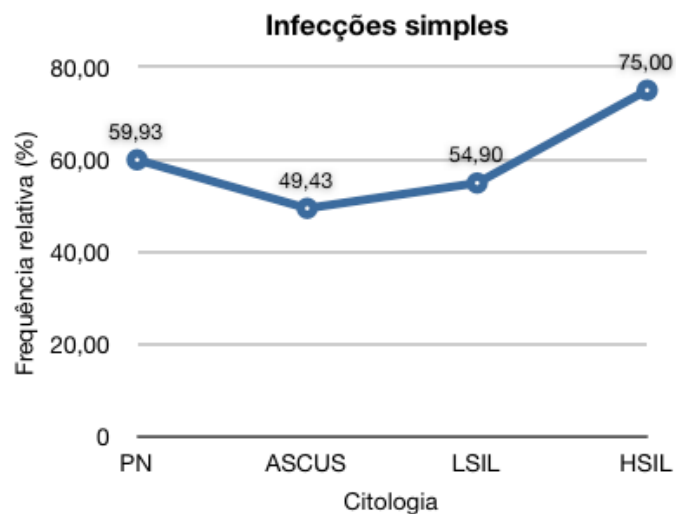


Figura 23 - Frequência relativa das infecções simples segundo o grau de lesão celular no exame citológico (colpocitologia). A proporção deste tipo de infecção é variável nos diferentes graus de lesão celular [p(trend)=0,51]. Padrão Normal (PN), Atipia em células escamosas de significado indefinido (ASCUS), Lesão escamosa intraepitelial de baixo grau (LSIL), Lesão escamosa intraepitelial de alto grau (HSIL).

A próxima análise realizada foi a avaliação do risco oncogênico associado ao HPV (baixo e alto risco) nos resultados PN, ASCUS, LSIL e HSIL. Nos 734 resultados HPV DNA positivos incluídos nesta parte 2 do estudo foram encontrados 1311 genótipos, sendo 967 (73,7%) de alto risco e 344 (26,3%) de baixo risco. Nesta contagem cada genótipo é contabilizado como um evento independentemente de como ocorreram, na forma de infecção simples ou múltipla. Nas amostras com Padrão Normal 1012 vírus foram encontrados, 728 (71,94%) de alto risco e 284 (28,06%) de baixo risco; Nos ASCUS foram 182, 145 (79,67%) de alto risco e 37 (20,33%) de baixo risco; Nos LSIL foram 97, 77 (79,38%) de alto risco e 20 (20,62%) de baixo risco; Nos HSIL foram 20, 17 (85%) de alto risco e 3 (15%) de baixo risco. Assim, a proporção de genótipos de alto risco aumentou com o aumento do grau de lesão celular observado na citologia, 71,94%, 79,67%, 79,38%, e 85% para PN, ASCUS, LSIL e HSIL, respectivamente [p(trend)=0,0087] (**Figura 24**).

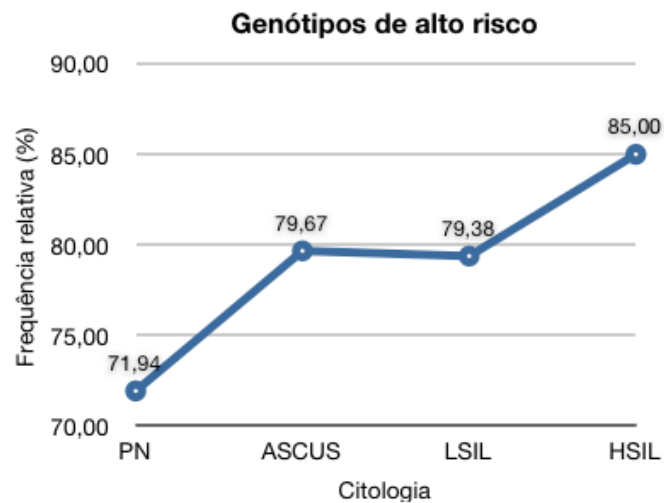


Figura 24 - Frequência relativa dos genótipos de HPV de alto risco segundo o grau de lesão celular no exame citológico (colpocitologia). A proporção dos genótipos oncogênicos aumenta com a gravidade da lesão celular [p(trend)=0,0087]. Padrão Normal (PN), Atipia em células escamosas de significado indefinido (ASCUS), Lesão escamosa intraepitelial de baixo grau (LSIL), Lesão escamosa intraepitelial de alto grau (HSIL).

Finalmente, avaliou-se a distribuição genotípica do HPV nos diferentes tipos de lesões cervicais. Além disso, analisou-se também a distribuição das espécies de HPV. Como pode ser observado na **Figura 25**, a distribuição dos tipos de HPV na totalidade das amostras foi em ordem decrescente 16, 56, 53, 44, 6, 39, 66, 68, 42, 31, 52, 58, 51, 73, 33, 59, 70, 18, 43, 40, 11, 82, 45, e 35; Nas amostras com Padrão Normal 16, 56, 44, 53, 6, 39, 42, 68, 66, 58, 31, 51, 52, 73, 59, 70, 33, 11, 40, 18, 45, 82, 35, e 43; Nas amostras com resultado ASCUS 16, 52, 56, 31, 53, 39, 73, 51, 43, 33, 44, 18, 58, 59, 68, 6, 66, 70, 42, 35, 82, 11, 40, e 45; Nos LSIL 16, 56, 66, 68, 53, 31, 51, 39, 18, 42, 43, 73, 6, 40, 44, 45, 33, 52, 58, 59, 35, 82, 70, e 11; Nos HSIL 16, 58, 73, 52, 56, 39, 68, 82, 66, 70, 40, e 44. Assim, pode-se observar que o HPV16 foi o mais prevalente em todos os grupos, o HPV 56 também se encontra entre os mais prevalentes. No geral, os genótipos de alto risco ganham prevalência com o aumento da gravidade das lesões, e os de baixo risco perdem. Como pode ser observado comparando as distribuições encontradas, os genótipos de baixo risco 6, 42, e 44, situam-se entre os mais frequentes somente nas amostras com padrão normal, e perdem posições com a gravidade da lesão. Entretanto, os genótipo de baixo risco também são encontrados nas lesões de alto grau.

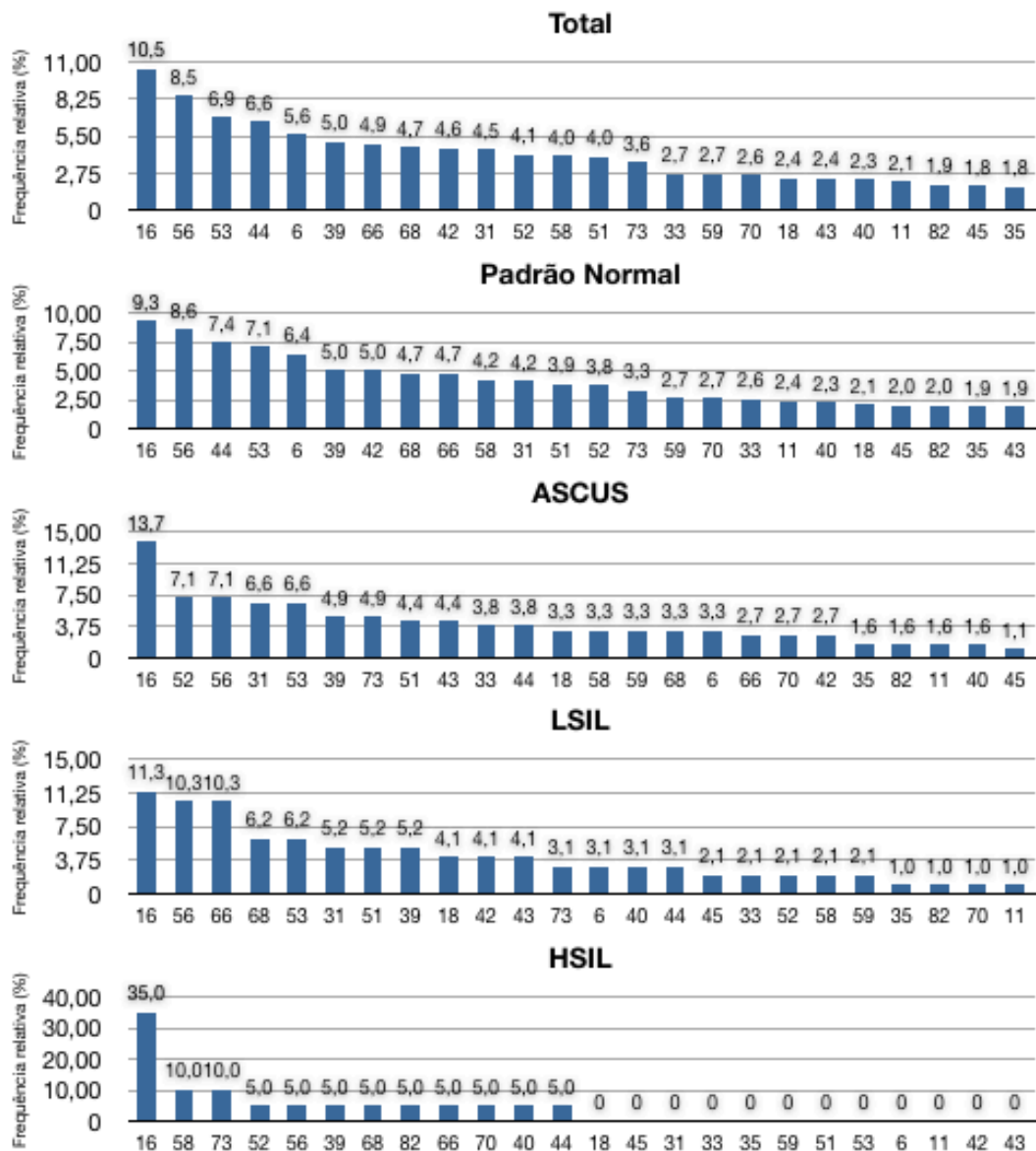


Figura 25 - Distribuição dos genótipos de HPV segundo o grau de lesão celular no exame citológico (colpocitologia). Padrão Normal (PN), Atipia em células escamosas de significado infeterminado (ASCUS), Lesão escamosa intraepitelial de baixo grau (LSIL), Lesão escamosa intraepitelial de alto grau (HSIL).

Diante deste achado, resolveu-se analisar a tendência individual de cada genótipo em aumentar ou diminuir sua frequência com a gravidade da lesão e comprovar estas observações. Os genótipos 16, 6 e 44 foram os únicos a apresentarem tendência de aumento/diminuição com a piora na gravidade das lesões celulares. O genótipo 16 apresentou as seguintes frequências 9,29%, 13,74%, 11,34%, 35,0% para PN, ASCUS, LSIL, e HSIL, respectivamente [p(trend)=0,0029]. O genótipo 6 apresentou as seguintes frequências 6,42%, 3,30%, 3,09%, e 0% para PN, ASCUS, LSIL, e HSIL, respectivamente [p(trend)=0,03]. O

genótipo 44 apresentou as seguintes frequências 7,41%, 3,85%, 3,09%, 5% para PN, ASCUS, LSIL, e HSIL, respectivamente [p(trend)=0,0029] (**Figura 26**).

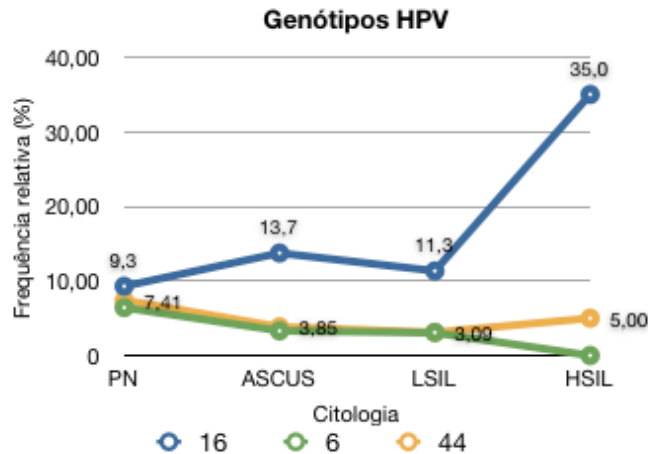


Figura 26 - Frequência relativa do HPV16, HPV6 e HPV 44 segundo o grau de lesão celular no exame citológico (colpocitologia). O HPV16 (alto risco) aumenta sua frequência com o aumento da gravidade da lesão celular [p(trend)=0,0029]. Enquanto, que o HPV6 [P(trend)=0,03] e o 44 [P(trend)=0,02] diminuem (ambos de baixo risco). Padrão Normal (PN), Atipia em células escamosas de significado indeterminado (ASCUS), Lesão escamosa intraepitelial de baixo grau (LSIL), Lesão escamosa intraepitelial de alto grau (HSIL).

Em relação à distribuição das espécies, observa-se que a mais frequente em todos os grupos é a A9 (16, 31, 33, 35, 52, 58, e 67), exceto em LSIL onde a mais frequente é a A6 (53, 69, 82, e 30). A distribuição das espécies de HPV na totalidade das amostras em ordem decrescente foi A9, A6, A7, A10, A5, A8, A1, e A11; Nas amostras com Padrão Normal foi A9, A6, A7, A10, A5, A1, A8, e A11; Nas amostras ASCUS A9, A7, A6, A10, A5, A8, A11, e A1; Nos LSIL A6, A9, A7, A10, A8, A5, A1, e A11; Nos HSIL A9, A7, A6, A11, A5, A8, A10, e A1 (**Figura 27**). Assim, pode-se observar que a espécie A9 foi a mais prevalente em todos os grupos, exceto em LSIL onde a A6 prevalece, ambas contendo apenas genótipos de alto risco. Observa-se, também, algumas variações nas prevalências das espécies, com destaque para a A10 (6, 11, e 44) que diminui sua ocorrência com o agravamento da lesão. Neste sentido, decidiu-se avaliar as tendências de variações das espécies de HPV.

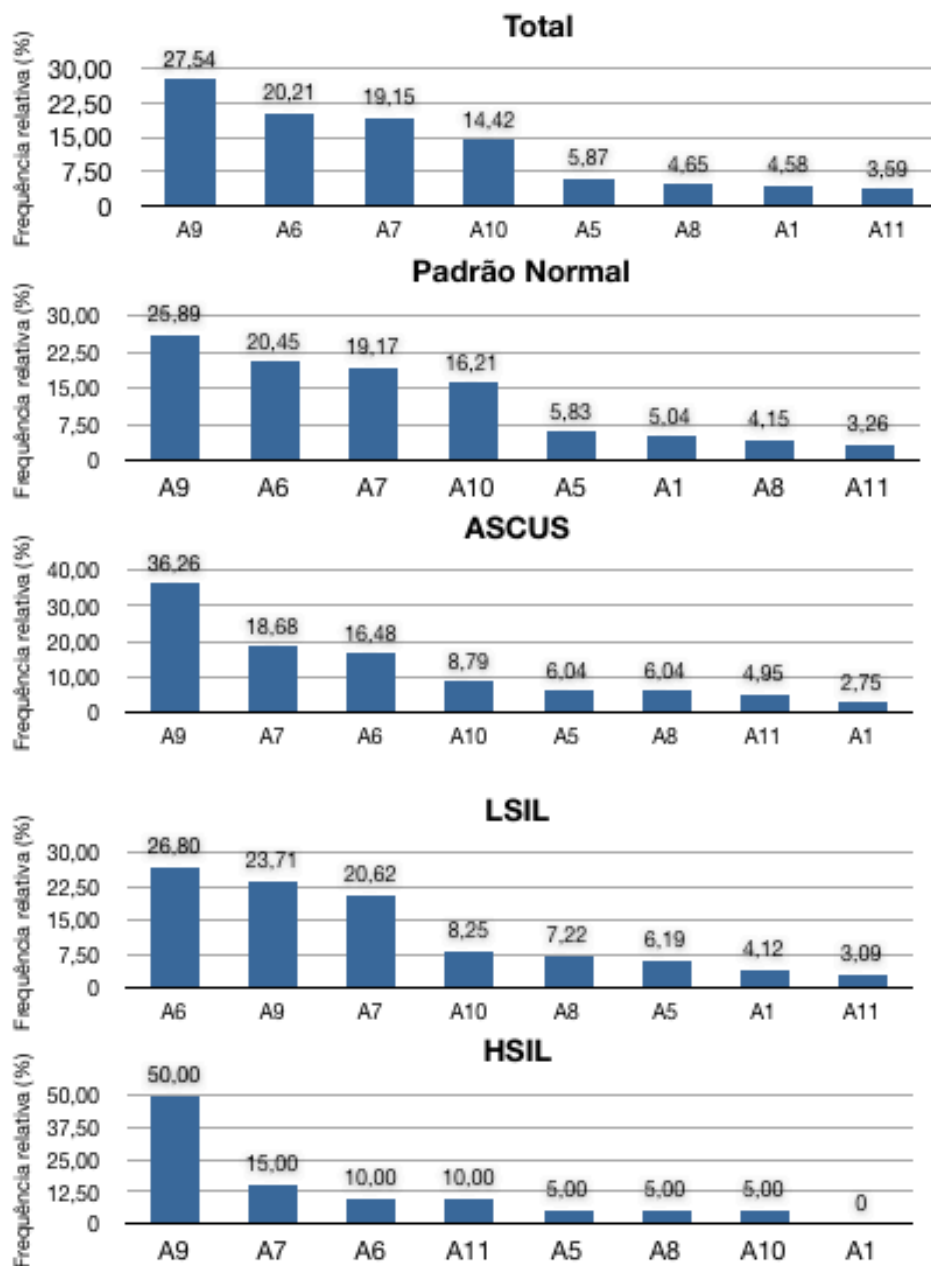


Figura 27 - Frequência relativa das espécies de HPV segundo o grau de lesão celular no exame citológico (colpocitologia). A espécie A9 foi a mais prevalente em todos os grupos, exceto em LSIL onde a A6 foi a mais prevalentes. Padrão Normal (PN), Atipia em células escamosas de significado indeterminado (ASCUS), Lesão escamosa intraepitelial de baixo grau (LSIL), Lesão escamosa intraepitelial de alto grau (HSIL).

As espécies A9 e A10 foram as únicas a apresentarem tendência de aumento/diminuição com a piora na gravidade das lesões celulares. A espécie A9 (16, 31, 33, 35, 52, 58, e 67) apresentou as seguintes frequências 25,9%, 36,3%, 23,7%, e 50,00% para PN, ASCUS, LSIL e HSIL, respectivamente [p(trend)=0,04], aumentando assim sua frequência com o grau de lesão. Por outro lado, a espécie A10 (6, 11, e 44) apresentou as seguintes frequências 16,21%, 8,79%, 8,25%, e

5,00% para PN, ASCUS, LSIL e HSIL, respectivamente [p(trend)=0,0013], diminuindo assim sua frequência com a piora da lesão (**Figura 28**).

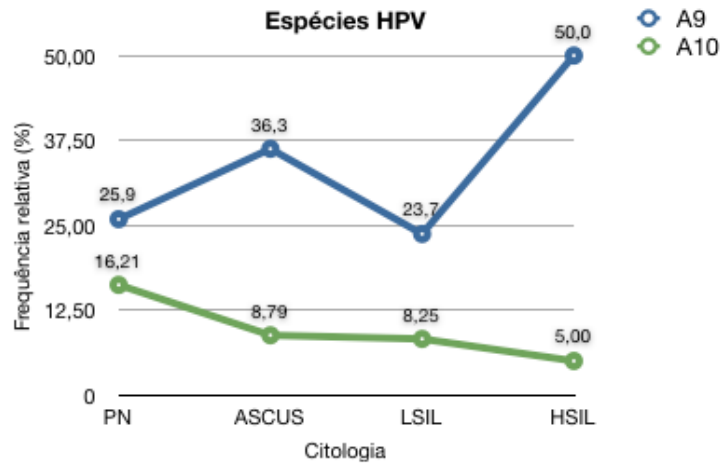


Figura 28 - Frequência relativa das espécies de HPV A9 e A10 segundo o grau de lesão celular no exame citológico (colpocitologia). A espécie A9 (alto risco) aumenta sua frequência com o aumento da gravidade da lesão celular [p(trend)=0,04]. Enquanto, que a A10 (baixo risco) [p(trend)=0,0013] diminui. Padrão Normal (PN), Atipia em células escamosas de significado indeterminado (ASCUS), Lesão escamosa intraepitelial de baixo grau (LSIL), Lesão escamosa intraepitelial de alto grau (HSIL).

Como discutido anteriormente, a idade, e por consequência, o comportamento sexual influenciam diretamente a infecção pelo HPV. Neste sentido, mulheres incluídas na parte 2 deste estudo foram agrupadas em três faixa etárias, menor ou igual a 30 anos, entre 31 e 44 anos, e maior ou igual a 45 anos. No total, 897 (46,9%), 782 (40,9%), 234 (12,2%) amostras foram incluídas nas faixas etárias ≤ 30 , 31-44, e ≥ 45 anos, respectivamente. Como a análise envolvia a influência do grau de lesão celular, esse total de amostras foi subdividido por faixa etária de acordo com o resultado do exame citológico, e por conseguinte, 788 (45,95%), 706 (41,17%), e 221 (12,89%); 74 (56,49%), 49 (37,40%), e 8 (6,11%); 29 (52,73%), 21 (38,18%), e 5 (9,09%); 6 (50,0%), 6 (50,0%), e 0 (0%) foram incluídos nos grupos PN, ASCUS, LSIL, e HSIL, respectivamente. Foram analisadas: positividade, infecções simples, infecções múltiplas, e genótipos de alto risco e baixo risco, além da distribuição dos genótipos e das espécies. Nas amostras incluídas nesta parte 2 do estudo a positividade para as faixas etárias ≤ 30 , 31-44, e ≥ 45 anos foi 417 (46,5%), 260 (33,2%), e 57 (24,40%), respectivamente [p(trend)<0,0001]. Nos resultados com padrão normal, 328 (41,62%), 206 (29,18%), e 50 (22,62%), respectivamente [p(trend)<0,0001]; Nos resultados ASCUS, 54 (72,97%), 30 (61,22%), e 3 (37,40%), respectivamente, [p(trend)=0,03]; Nos resultados LSIL, 29 (100,0%), 18 (85,71%), e

4 (80,0%), respectivamente, [p(trend)=0,03]; Nos resultados HSIL, 6 (100,0%), 6 (100,0%), e 0 (0,0%), respectivamente [p(trend)<0,0001] (**Figura 29**). Assim, observa-se que a positividade aumenta com grau de lesão celular e diminui com a idade em todas as faixas etárias analisadas.

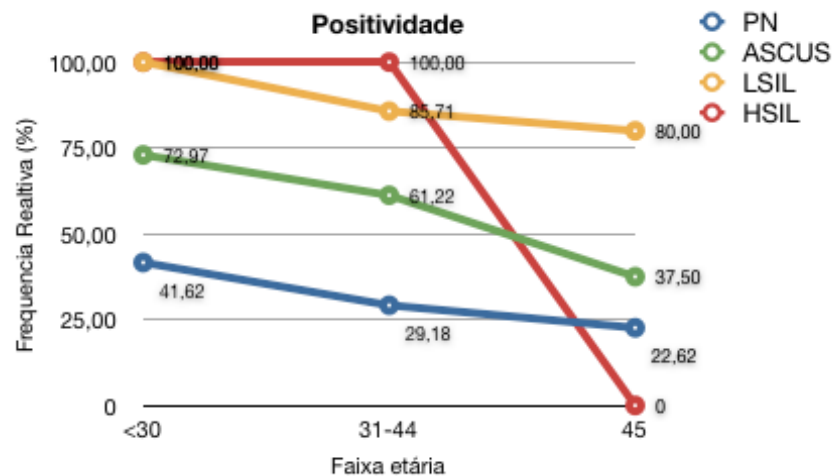


Figura 29 – Positividade para HPV em cada lesão cervical divididas nas faixas etárias ≤30, 31-44, e ≥45 anos. Análise da positividade nas faixas etárias ≤30, 31-44, e ≥45 anos. A positividade para o HPV aumenta com grau de lesão celular e diminui com a idade em todas as faixas etárias, p(trend)<0,0001, p(trend)=0,03, p(trend)=0,03, e p(trend)<0,0001 para PN, ASCUS, LSIL, e HSIL, respectivamente.

Em seguida, analisou-se a proporção de infecção simples e infecção múltipla nas três faixas etárias. No total, as infecções simples nas faixas etárias ≤30, 31-44, e ≥45 anos foi 216 (51,8%), 174 (66,9%), 42 (73,7%), e múltiplas 201 (48,2%), 86 (33,1%), 15 (26,3%), respectivamente. Ou seja, a proporção de infecções simples aumentava, enquanto as múltiplas diminuía com a idade [p(trend)<0,0001]. Resultado semelhante ao encontrado na parte 1 do estudo que incluiu todas as amostras. Nas amostras com padrão normal, a proporção de infecções simples nas faixas etárias ≤30, 31-44, e ≥45 anos foi 177 (53,96%), 139 (67,48%), e 35 (70,0%), respectivamente [p(trend)<0,0011]; Nos resultados ASCUS, 24 (44,44%), 16 (53,33%), e 3 (100%), respectivamente [p(trend)=0,1]; Nos resultados LSIL, 11 (37,9%), 14 (77,78%), e 4 (100%), respectivamente [p(trend)=0,0014]; Nos resultados HSIL, 4 (66,67%), 5 (83,33%), e 0 (80,0%), respectivamente [p(trend)=0,50] (**Figura 30**). Com relação às infecções múltiplas deve-se considerar o raciocínio contrário ao descrito para infecções simples, uma vez que nos cálculos das proporções e nas análises estatísticas foram comparando infecções simples *versus* infecções múltiplas.

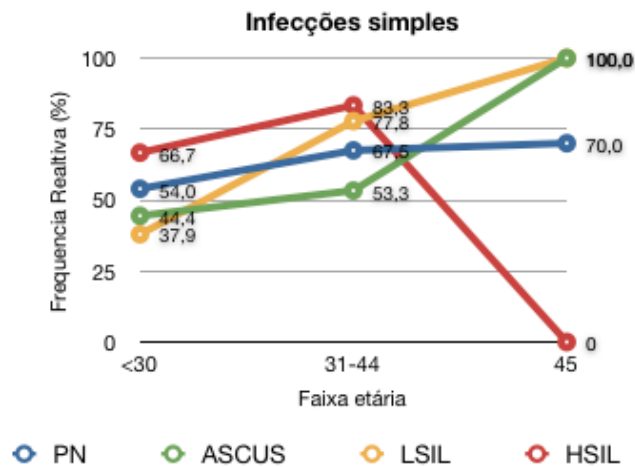


Figura 30 - Proporção de infecções simples em cada lesão cervical nas faixas etárias ≤30, 31-44, e ≥45 anos. No geral, a proporção de infecção simples aumenta com a idade [p(trend)<0,0001], o mesmo ocorre para PN, ASCUS, LSIL, e HSIL, entretanto significância estatística foi obtida para PN [p(trend)<0,0011], e LSIL [p(trend)=0,0014], mas não para ASCUS [p(trend)=0,1] e HSIL [p(trend)<0,5].

A próxima análise realizada foi a avaliação do risco oncogênico associado ao HPV (baixo e alto risco) nas faixas etárias ≤30, 31-44, e ≥45 anos segundo os possíveis resultados citológicos PN, ASCUS, LSIL e HSIL. Novamente, nesta contagem cada genótipo é contabilizado como um evento independentemente de como ocorreram, na forma de infecção simples ou múltipla. No geral, os genótipos de alto risco diminuem com a idade, pois apresentaram frequências relativas de 634 (77,9%), 318 (75,7%), 49 (63,6%) para as faixas etárias ≤30, 31-44, e ≥45, respectivamente [p(trend)=0,016]. Sendo que as amostras com citologia normal são as responsáveis por esta tendência, pois para as amostras PN, a proporção de genótipos de alto risco nas faixas etárias ≤30, 31-44, e ≥45 anos foi 470 (76,55%), 242 (74,01%), e 42 (70,0%), respectivamente [p(trend)=0,0097]; Nos resultados ASCUS, 101 (83%), 46 (79%), e 3 (100%), respectivamente [p(trend)=0,77]; Nos resultados LSIL, 53 (79%), 22 (81%), e 4 (100%), respectivamente [p(trend)=0,41]; Nos resultados HSIL, 10 (83%), 8 (100%), e 0 (00,0%), respectivamente [p(trend)=0,22] (**Figura 31**). Assim, os genótipos de alto risco diminuem com a idade apenas na totalidade das amostras e nas com Padrão Normal na citologia. Em ASCUS e LSIL a proporção de genótipos de alto risco tende a aumentar, entretanto não foi observado significância estatística. Não ocorreram pacientes com HSIL em idade maior ou igual a 45 anos.

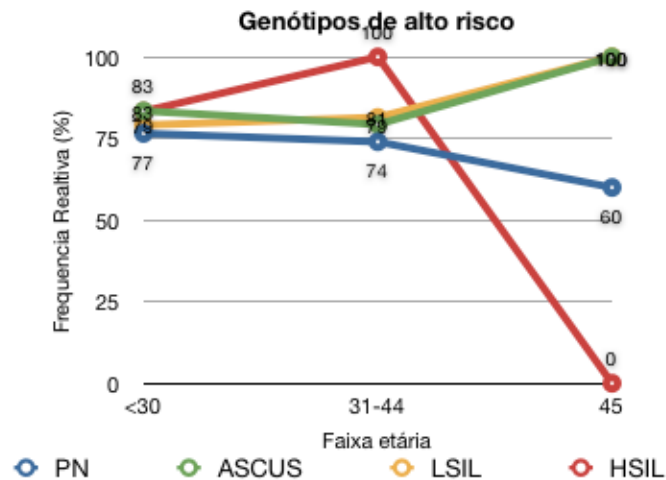


Figura 31 – Proporção de genótipos de alto risco em cada lesão cervical nas faixas etárias ≤ 30 , 31-44, e ≥ 45 anos. No geral, a proporção de genótipos de alto risco diminui com a idade [p(trend) $<0,0001$], o mesmo ocorre para PN [p(trend) $<0,0097$]; Para ASCUS [p(trend)=0,77]; LSIL [p(trend)=0,41]; e HSIL [P(trend)=0,22]. A tendência dos genótipos de alto risco é aumentar entretanto sem significância estatística.

Finalmente, avaliou-se a distribuição genotípica e das espécies de HPV nos diferentes tipos de lesões cervicais nas faixas etárias ≤ 30 , 31-44, e ≥ 45 anos. A distribuição genotípica do HPV nas amostras PN, ASCUS, LSIL e HSIL, pode ser observada nas **Figuras 32, 33, 34 e 35**, respectivamente. Resumidamente, os genótipos mais frequentes nas amostras PN com idade menor ou igual a 30 anos em ordem decrescente são 16, 56, 53, 39, 6, e 44; entre 31 e 44 anos são 16, 44, 56, 53, 6, e 66; e maior ou igual a 45 anos são 44, 56, 6, 42, 16, e 58. Nas amostras ASCUS com idade menor ou igual 30 anos são 16, 31, 56, 39, 52, e 51; entre 31 e 44 anos são 16, 52, 53, 43, 56, e 73; maior ou igual a 45 anos são 16, 52, e 53. Nas amostras LSIL com idade menor ou igual 30 anos são 16, 56, 53, 51, 39, e 66; entre 31 e 44 anos são 66, 56, 16, 31, 68, e 43; maior ou igual a 45 anos são 16, 18, 56, e 68. Nas amostras HSIL com idade menor ou igual 30 anos são 16, 58, 52, 56, 73, e 82; entre 31 e 44 anos são 16, 39, 68, 73, e 70. Não foram observados resultados HSIL nos pacientes com maior ou igual a 45 anos. Não foi avaliada a influência da idade sobre a distribuição das espécies, devido ao excesso de grupo resultantes dessa análise, baixo número de amostras em alguns dos grupos, e por acreditarmos que seja redundante diante da análise da influência da idade sobre a distribuição genotípica.

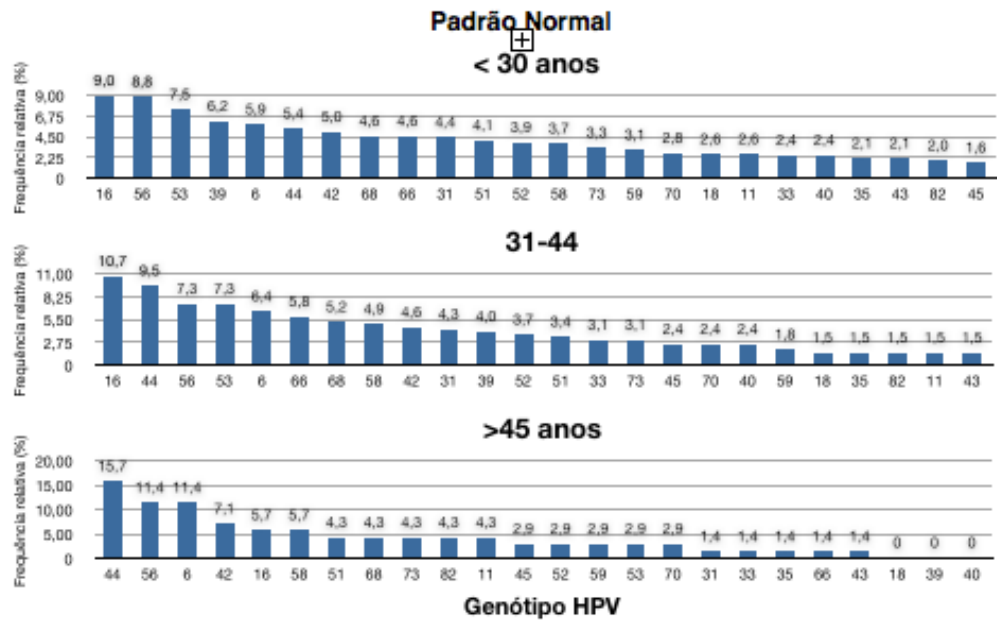


Figura 32 - Distribuição genotípica do HPV nas amostras com padrão normal no exame citológico nas faixas etárias ≤30, 31-44, e ≥45 anos.

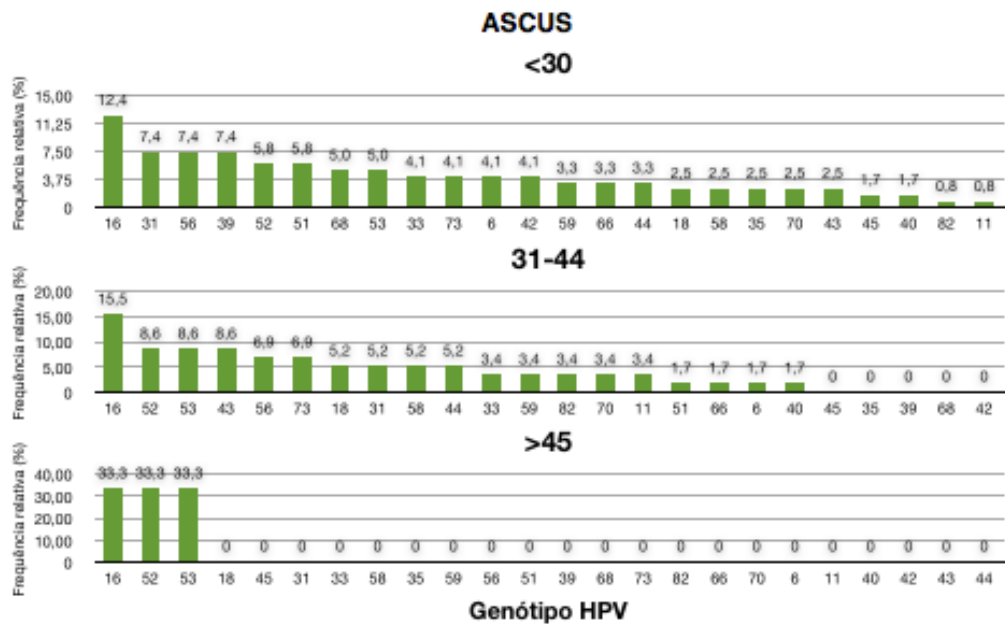


Figura 33 - Distribuição genotípica do HPV nas amostras com ASCUS no exame citológico nas faixas etárias ≤30, 31-44, e ≥45 anos.

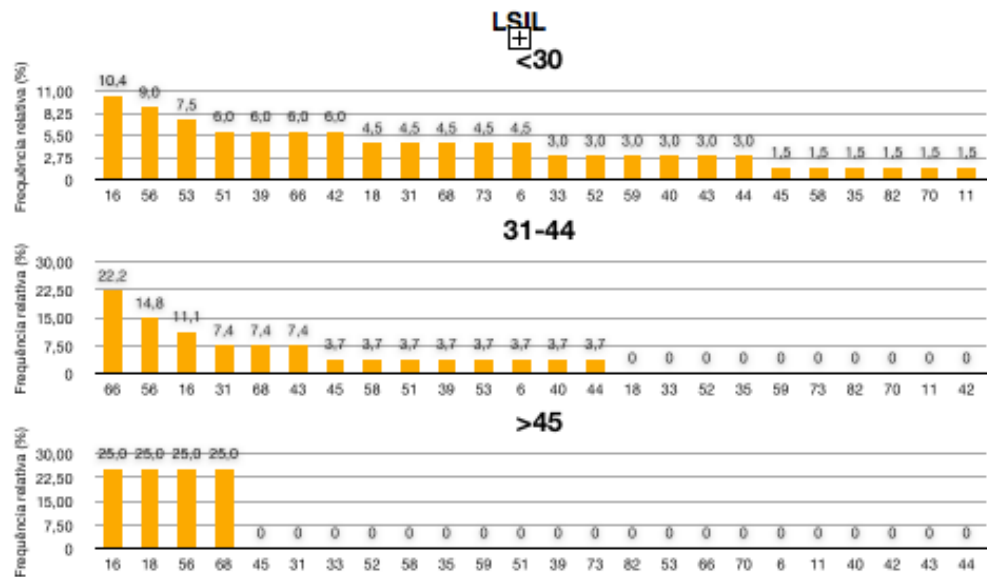


Figura 34 - Distribuição genotípica do HPV nas amostras com LSIL no exame citológico nas faixas etárias ≤30, 31-44 anos, e ≥45 anos.

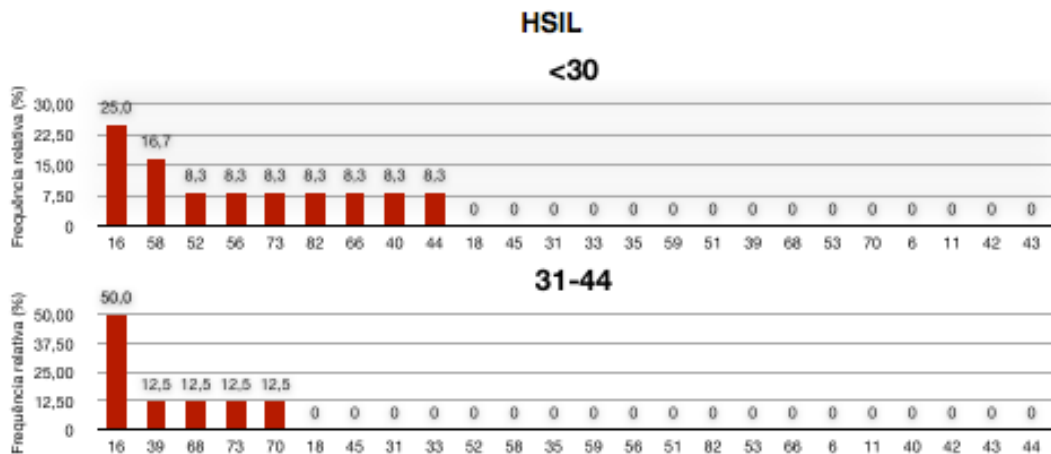


Figura 35 - Distribuição genotípica do HPV nas amostras com HSIL no exame citológico nas faixas etárias ≤30, e 31-44.

4.3 PARTE 3

4.3.1 Análise no banco de dados de amostras que realizaram genotipagem de HPV e biópsia de lesão peniana.

Na terceira parte deste estudo analisou-se retrospectivamente o banco de dados de nosso laboratório clínico com a finalidade de identificar os

genótipos/espécies de HPV presentes em lesões penianas, e correlacionar os diferentes tipos de alterações celulares das biópsias com a presença do vírus, tipo de infecção (múltipla e simples) e sua oncogenicidade, além de comparar os diagnósticos histológicos com o diagnóstico molecular. Para isto, pacientes que possuíam solicitações médicas para os exames de genotipagem para HPV e biópsia peniana no mesmo dia foram incluídos nesta etapa. Assim, a finalidade desta análise é revelar o conhecimento sobre a infecção do HPV em homens que permanece escondido na base de dados de um laboratório clínico.

No total, 43 indivíduos do sexo masculino fizeram a genotipagem do HPV e também a biópsia da lesão peniana. A média de idade (desvio padrão) destes indivíduos foi 30,3 (\pm 7,9) anos, apresentando a seguinte distribuição em faixas etárias: 1 (2,3%) entre 11 e 20 anos; 27 (62,8%) entre 21 e 30 anos; 10 (23,3%) entre 31 e 40 anos; 4 (9,3%) entre 41 e 50 anos; e 1 (2,3%) entre 51 e 60 anos. O exame de genotipagem revelou que o DNA do HPV estava presente em 31 (72,1%) e ausente em 12 (27,9%) destas amostras. Destas 31 amostras positivas, 19 (61,3%) apresentavam infecção múltipla e 12 (38,7%) infecção simples. Assim, a positividade nestas amostras foi de 72,1% e as infecções múltiplas eram predominantes.

Dos 68 diferentes genótipos encontrados nestas 43 amostras, 39 (57,3%) eram de baixo risco e 29 (42,6%) eram de alto risco. A distribuição destes 68 genótipos pode ser evidenciada na **Figura 36**. Observa-se que os cinco mais prevalentes são os tipos 6 (25%), 11 (13,2%), 42 (10,3%), 39 (5,9%) e 44 (5,9%); quatro deles de baixo risco (6, 11, 42, 44), sendo que genótipo de maior ocorrência é o 6. No geral, os genótipos de baixo risco são mais prevalentes do que os de alto risco (57,3% *versus* 42,6%).

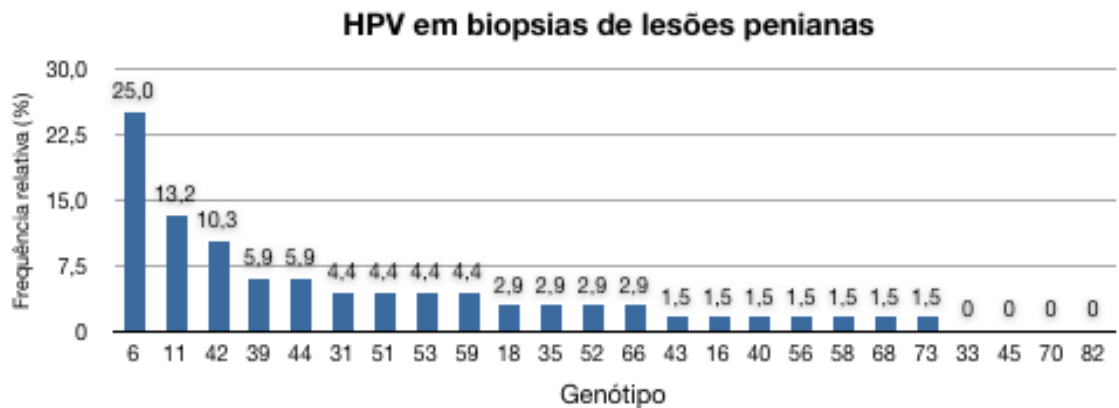


Figura 36 - Distribuição genotípica do HPV nas biópsias de lesões penianas.

Em relação às espécies de HPV, a distribuição observada em ordem decrescente foi A10, A7, A9, A1, A6, A5, A8, e A11, com 44,1%, 14,7%, 13,2%, 10,3%, 8,8%, 4,4%, 2,9%, e 1,5%, respectivamente (**Figura 37**). Novamente, foi observada uma maior importância dos genótipos de baixo risco nas lesões penianas, pois, a espécie A10 (6, 11 e 44), é responsável por 44,1% dos genótipos encontrados.

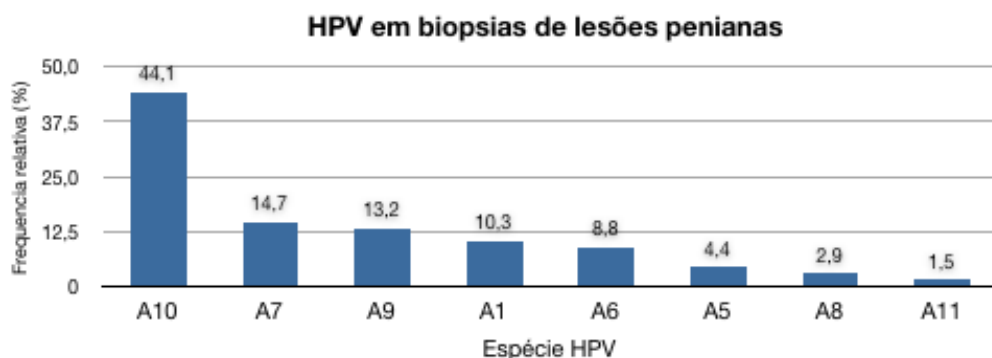


Figura 37 - Distribuição das espécies de HPV nas biópsias de lesões penianas.

Dos 43 indivíduos incluídos no estudo, o exame histológico revelou que 28 (65,1%) apresentavam alterações sugestivas de infecção viral (SHPV), enquanto 15 (34,9%) não possuíam tais alterações (NSHPV). Por outro lado, a genotipagem revelou que o DNA do HPV estava presente em 31 (72,1%) e ausente em 12 (27,9%) destas amostras. Comparando-se o resultado da histologia com o da genotipagem observou-se que 23 (53,4%) amostras eram positivas para os dois

exames, 7 (16,2%) eram negativas para os dois exames, 5 (11,6%) positivas apenas para a histologia, 8 (18,6%) positiva apenas para genotipagem (**tabela 5**).

Tabela 5- Correlação entre o diagnóstico histológico e a presença do DNA do HPV na genotipagem.

Biópsia peniana	Genotipagem HPV		Total
	Positiva	Negativo	
SHPV ¹	23(53,4%)	5 (11,6%)	28
NSHPV ²	8 (18,6%)	7 (16,2%)	15
Total	31	12	43

Legenda: 1- sugestivo de infecção viral; 2- não sugestivo de infecção viral.

Conclusões de laudos SHPV (n=28): Hiperplasia epitelial (n=14, 50%), Hiperplasia epitelial papilomatosa (n=8, 28,5%), e Condiloma acuminado (n=6, 21,5%).

Conclusões de laudos NSHPV (n=15): Ceratose seborréica (n=3, 20%), Doença bolhosa intradérmica (n=1, 6,6%), Líquen escleroso (Balanite xerótica) (n=1, 6,6%), Nevo melanocítico intradérmico (n=1, 6,6%), Molusco contagioso (n=1, 6,6%), Eritroplasia de queyrat (n=1, 6,6%), Pele sem alterações diagnósticas (n=2, 13,5%), Sugestivo de fibroma mole (n=1, 6,6%), Nevo melanocítico juncional (n=1, 6,6%), e Hiperplasia epitelial escamosa (n=3, 20%).

Ao comparar a conclusão dos laudos das biópsias com presença ou ausência do DNA do HPV na genotipagem notou-se que os tipos de vírus testados estavam ausentes em alguns resultados SHPV, e presente em alguns resultados NSHPV.

Conclusões de laudos com genotipagem positiva (n=31): Ceratose seborréica (n=2, 6,4%), Hiperplasia epitelial papilomatosa (n=6, 19,4%), Hiperplasia epitelial (n=11, 35,5%), Doença bolhosa intradérmica (n=1, 3,2%), Líquen escleroso (n=1, 3,2%), Hiperplasia epitelial escamosa (n=2, 6,4%), Eritroplasia de queyrat (n=1, 3,2%), Pele sem alterações diagnósticas (n=1, 3,2%), e Condiloma acuminado (n=6, 19,4%).

Conclusões de laudos com genotipagem negativa (n=12): Hiperplasia epitelial (n=3, 25%), Hiperplasia epitelial papilomatosa (n=2, 16,7%), Hiperplasia epitelial escamosa (n=1, 8,3%), Ceratose seborréica (n=1, 8,3%), Nevo melanocítico

intradérmico (n=1, 8,3%), Nevo melanocítico juncional (n=1, 8,3%), Sugestivo de fibroma mole (n=1, 8,3%), Pele sem alterações diagnósticas (n=1,8,3%), e Molusco contagioso (n=1, 8,3%).

Dos resultados SHPV, o DNA do HPV foi detectado em 11 das 14 (78,5%) Hiperplasias epiteliais, 6 das 8 (75%) Hiperplasias epiteliais papilomatosas, e em 6 dos 6 (100%) Condilomas acuminados.

Em seguida, como controle, analisou-se individualmente a associação dos tipos de alterações morfológicas nas lesões epiteliais com a conclusão da análise histológica que fortemente sugerem ou não a presença do HPV (SHPV ou NSHPV), com a intenção de testar as nossas análises em relação à capacidade de identificar associações entre alterações citológicas e resultado sugestivo da presença do vírus. Assim, ao comparar a frequência das alterações citopáticas com o resultado SHPV na conclusão da biópsia, foi visto que todas as alterações pesquisadas no exame histológico associam-se significativamente com a possível presença do vírus na amostra, exceto hipergranulose e queratinização (**Tabela 6**). Assim, oito das dez alterações citopáticas avaliadas se associaram significativamente à conclusão SHPV.

Tabela 6 - Associação entre as alterações citopáticas da histologia com resultado sugestivo da presença do HPV na biópsia.

Critérios	NSHPV	SHPV	p
Lesão exofítica	3 (6,9%)	17 (39,5%)	0,023
Hipercetarose	7 (16,2%)	28 (65,1%)	≤ 0,001
Paraceratose	1 (2,3%)	13 (30,2%)	0,015
Acantose irregular	7 (16,2%)	28 (65,1%)	≤ 0,001
Papilomatose	1 (2,3%)	25 (58,1%)	≤ 0,001
Hipergranulose	1 (2,3%)	6 (13,9%)	0,391
Atipia coilocitótica	0 (0%)	20 (46,5%)	≤ 0,001
Queratinização	0 (0%)	4 (9,3%)	0,28
Hiperplasia e PPB ¹	0 (0%)	16 (37,2%)	≤ 0,001

Legenda: 1- perda da polaridade basal.

Em seguida, para comparar o exame molecular com o histológico, os tipos de alterações morfológicas foram comparadas individualmente com a presença ou não do DNA do HPV na amostra, com o propósito de identificar a associação entre elas. Ao executar a análise, verificou-se que três alterações vistas no exame histológico associaram-se significativamente com a presença do vírus, pois estas foram mais frequentes nos resultados HPV DNA positivos do que nos HPV DNA negativos: hiperqueratose (67,4% *versus* 13,9%, $p=0,003$), acantose irregular (67,4% *versus* 13,9%, $p=0,003$), e papilomatose (51,10% *versus* 9,3%, $p=0,037$). A atipia coliocitótica, patognomônico da infecção pelo HPV, apresentou associação próxima da significância (6,9% *versus* 39,5%, $p=0,099$) (**Tabela 7**). Assim, em consequência da associação não significativa entre os exames comparados, três das dez alterações citopáticas avaliadas se associaram significativamente à presença do vírus na amostra.

Tabela 7 - Associação entre as alterações citopáticas da histologia com resultado do exame molecular de HPV.

Crítérios	HPV Negativo	HPV Positivo	p
Lesão exofítica	4 (9,3%)	16 (37,2%)	0,327
Hiperqueratose	6 (13,9%)	29 (67,4%)	0,003
Paraceratose	4 (9,5%)	10 (23,5%)	1
Acantose irregular	6 (13,9%)	29 (67,4%)	0,003
Papilomatose	4 (9,3%)	22 (51,1%)	0,037
Hipergranulose	1 (2,3%)	6 (13,9%)	0,652
Atipia coliocitótica	3 (6,9%)	17 (39,5%)	0,099
Queratinização	1 (2,3%)	3 (6,9%)	1
Hiperplasia e PPB ¹	2 (4,6%)	14 (32,5%)	0,158

Legenda: 1- perda da polaridade basal.

A próxima análise incluiu apenas as amostras positivas no exame de genotipagem. Como descrito anteriormente, das 31 amostras positivas para o DNA do HPV, 19 (61,3%) apresentavam infecção múltipla, e 12 (38,7%) infecção simples. Comparando as alterações citopáticas nas infecções múltiplas e simples verificou-se que paraceratose (29% *versus* 3,2%, $p=0,046$), atipia coliocitótica (48,3% *versus* 6,4%, $p<0,001$) e hiperplasia e perda da polaridade basal (38,7% *versus* 6,4%, $p=0,024$) estavam significativamente mais frequentes nas infecções múltiplas que na

simples (**Tabela 8**). Assim, algumas alterações citopáticas associaram com a presença de mais de um tipo de vírus na amostra, sugerindo que a multiplicidade de genótipos seja responsável pela sua ocorrência.

Análise semelhante foi realizada considerando a oncogenicidade do HPV. Ao comparar as alterações citopáticas com a infecção por genótipos de baixo e alto risco verificou-se que estas não diferiram significativamente com o risco genótipo-específico (**Tabela 9**). Assim, este resultado sugere que a oncogenicidade dos genótipos não tem influência sobre a ocorrência das lesões celulares testadas.

Tabela 8 - Associação entre as alterações citopáticas com o tipo de infecção (Simples ou Múltipla).

Critérios	Simples	Múltipla	p
Lesão exofítica	4 (12,9%)	12 (38,7%)	0,149
Hiperkeratose	11 (35,4%)	18 (58%)	1
Parakeratose	1 (3,2%)	9 (29%)	0,046
Acantose irregular	11 (35,4%)	18 (58%)	1
Papilomatose	7 (22,5%)	15 (48,3%)	0,253
Hipergranulose	4 (12,9%)	2 (6,4%)	0,174
Atipia coliocitótica	2 (6,4%)	15 (48,3%)	≤ 0,0001
Queratinização	0 (0%)	3 (9,6%)	0,265
Hiperplasia e PPB ¹	2 (6,4%)	12 (38,7%)	0,024

Legenda: 1- perda da polaridade basal.

Tabela 9 - Associação entre as alterações citopáticas com o risco atribuído ao tipo do vírus (Baixo e Alto Risco).

Critérios	Baixo	Alto	p
Lesão exofítica	29 (42,6%)	13 (19,1%)	0.1319
Hiperkeratose	40 (58,8%)	25 (36,7%)	1
Parakeratose	21 (30,8%)	8 (11,7%)	0.1378
Acantose irregular	40 (58,8%)	25 (36,7%)	1
Papilomatose	36 (52,9%)	19 (27,9%)	0.22
Hipergranulose	6 (8,8%)	3 (4,4%)	1
Atipia coliocitótica	29 (42,6%)	20 (29,4%)	0.5834
Queratinização	7 (10,2%)	3 (4,4%)	0.7303
Hiperplasia e PPB ¹	23 (33,8%)	19 (27,9%)	0.1991

Legenda: 1- perda da polaridade basal.

5 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo sobre o HPV com uma grande amostragem que utiliza o PapilloCheck® como técnica de genotipagem. Até o momento, apenas dois estudos descreveram distribuições genotípicas utilizando esta metodologia. O primeiro descreveu a distribuição dos tipos de HPV em neoplasias intra-epiteliais de vulva em 59 pacientes na Inglaterra (89). O segundo descreveu a distribuição dos tipos de HPV em amostras anais com anormalidade citológica relacionadas ao vírus em 67 homens HIV positivos na França (90). O trabalho aqui apresentado descreve a distribuição genotípica do HPV em 4231 amostras de homens e mulheres que realizaram o exame de genotipagem em um grande laboratório clínico do Distrito Federal, Brasil.

O presente trabalho baseou-se na análise de banco de dados. As vantagens de se usar dados existentes são economia de tempo e de recursos financeiros. Dessa forma, uma questão de pesquisa que poderia demandar muito tempo e recursos para ser investigada pode ser respondida de forma rápida e barata (32). Se as 4231 genotipagens deste estudo fossem executadas a custo de um projeto de pesquisa, somente esta etapa custaria R\$423,100.00.

Como será discutido detalhadamente abaixo, os achados deste trabalho reproduzem os dados da literatura, e revela que informações científicas importantes podem ser retiradas de um banco de dados de um laboratório clínico. Entretanto, existem desvantagens em usar dados existentes como, não selecionar a população estudada, as variáveis coletadas, e a forma com que as variáveis foram aferidas e registradas. Pois, já estão predeterminadas antes do início da pesquisa (32).

Outra limitação deste estudo é que o PapilloCheck®, e todas as tecnologias de genotipagem para HPV disponíveis atualmente, não apresentam a mesma sensibilidade para detecção dos diferentes genótipos. Tal diferença é uma fonte de variação para a distribuição genotípica, principal proposta deste estudo. Este fato torna difícil a comparação com estudos anteriores. Entretanto, com o aumento do número de publicações utilizando PapilloCheck®, comparações entre diferentes regiões, países, e tipos de amostras poderão ser realizados com o estudo aqui apresentado.

A importância deste estudo reside na grande amostragem, na avaliação de ambos os sexos, e no uso de uma metodologia robusta, extensivamente comparada,

e validado para rotina laboratorial, com registro no “U.S. Food and drug Administrator - FDA” e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). O reconhecimento e comprovação desta importância veio com o prêmio de um dos melhores resumos enviados no congresso da Sociedade Americana de Química clínica, em Atlanta, EUA, 2011. Atualmente, o mais importante congresso mundial em Análise clínicas.

A seguir, no decorrer desta discussão serão detalhadas individualmente as variáveis avaliadas no trabalho, como positividade, tipo de infecção, oncogenicidade viral, distribuição das espécies e distribuição genotípica. Além das novas descobertas identificadas neste estudo.

5.1 POSITIVIDADE

A positividade para o HPV nos diferentes grupos incluídos neste estudo foi bastante diversificada, variando de 26,8% nas mulheres com mais de 45 anos a 100% nas mulheres com lesões de alto grau. Na totalidade dos exames de genotipagem pelo PapilloCheck® a positividade foi 44,3%, e as mulheres apresentam menor positividade que os homens (40,2% *versus* 56,8%). As mulheres mais velhas apresentaram positividade menor que as mulheres mais novas (26,8% *versus* 49,1%), e as com padrão citológico normal (34%) tiveram positividade menor que as com alteração no exames citológico, ASCUS (66,4%), LSIL (92,7%), e HSIL (100%). Além disso, os homens mais velhos apresentaram positividade menor que os mais novos (43% *versus* 63,8%). Homens e mulheres de meia idade apresentaram positivities intermediárias, 33,9% e 54,1%, respectivamente. Ademais, as maiores positivities foram para homens com lesões penianas (72,8%) e mulheres com lesões citológicas LSIL (92,7%), e HSIL (100%), respectivamente (Figura 38). Assim, os dados do presente estudo sugerem que a prevalência para o HPV sofre influência do gênero e idade do paciente da presença ou não de lesões histológicas e ou citológicas sugestivas de infecção pelo HPV.

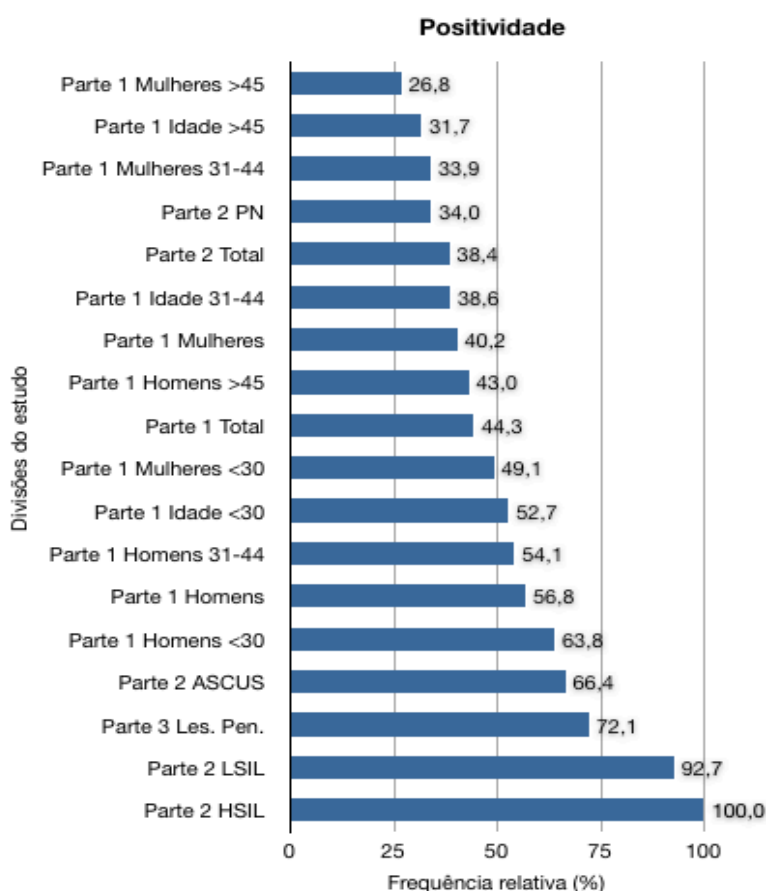


Figura 38 - Distribuição da positividade nos diferentes grupos incluídos nas partes 1, 2 e 3 deste estudo.

Na literatura, observa-se que a positividade para o HPV também é bastante variável tanto nos homens quanto nas mulheres. Poucos estudos compararam a positividade em ambos simultaneamente. Entretanto, esta questão quando avaliada, observa-se que os homens tem mais resultados positivos que as mulheres (91). Estudos utilizando teste para DNA de HPV em indivíduos assintomáticos na população geral estimam que a positividade para a infecção varie de 2-44% nas mulheres (92) e de 1,2%-84% nos homens (1, 93).

Essa ampla variação nas estimativas de positividade é bem explicada por diferenças de idade e comportamento sexual, por diferenças na sensibilidade molecular dos vários ensaios usados para detectar o DNA do HPV, e devido ao fato das populações estudadas serem diferentes. Além disso, nos homens, positividade pode variar a depender do sítio anatômico e espécime avaliado (93, 94).

A positividade para HPV nas mulheres que fizeram PapilloCheck® e citologia cervical é de 38,37%, semelhante a observada para mulheres no total 40,2%. Além disso, observou-se que a positividade aumenta com o piora do grau de lesão celular

na citologia, 34,05%, 66,41%, 92,73%, e 100% para PN, ASCUS, LSIL e HSIL, respectivamente. Em um estudo anterior realizado no Distrito Federal (DF), foi observada uma prevalência de 62% de infecção por HPV entre mulheres portadoras de anormalidades características de infecção por HPV nos exames citopatológicos cervicais (95).

Em um estudo realizado no país Basco, Espanha, que também utilizou o sistema de classificação citológica de Bethesda 2001, mas incluiu apenas citologias anormais revelou que a positividade geral foi de 69,8% e aumentava com o grau de lesão celular [ASCUS (61,4%), LSIL (80%) e HSIL (77,8%)], e a prevalência do HPV era maior nas mulheres mais jovens que nas mais velhas, concordando com os resultados do presente estudo. Por outro lado, o DNA do HPV não foi detectado em 25% das amostras HSIL, divergindo de nossos resultados (100%) (96).

Recentemente, Guan e colaboradores descreveram, em uma meta análise que incluiu 423 estudos, a distribuição genotípica do HPV de alto risco em 115,789 mulheres, todas positivas para o DNA do HPV. Neste estudo, foram incluídas todas as possíveis classificações para doença cervical até o câncer, PN (72%), ASCUS (4%), LSIL (5%) e HISL (2%), (Para facilitar a comparação com nosso trabalho apenas os resultados para PN, ASCUS, LSIL, e HISL serão descritos). No geral, a positividade para o HPV foi 31,3% e aumentou com o aumento da severidade da doença cervical PN (12%), ASCUS (52%), LSIL (76%) e HSIL (85%). O estudo também subdividiu os trabalhos analisados por continente, e a positividade na América do sul foi PN (24%), ASCUS (45%), LSIL (81%) e HSIL (85%).

Na terceira parte deste trabalho, a positividade para o HPV nos homens com lesões genitais foi de 72,1%, a terceira maior positividade deste estudo ficando atrás apenas das mulheres com citologia LSIL e HSIL. Recentemente, o estudo prospectivo multinacional (HPV in men - HIM), demonstrou que a positividade para homens com verrugas genitais foi de 80,4%, as (85). A semelhança entre as proporções de positividade entre os homens com lesões genitais deste estudo com os homens com verrugas genitais do estudo HIM, pode ser decorrência da semelhança entre os grupos, confirmando a alta positividade do HPV em homens com lesões genitais.

Ainda na parte três do estudo, os achados histológicos associados à presença do HPV são papilomatose, coilocitose, vacuolização, acantose, paraceratose, hiperkeratose, disceratose, inflamação e hipergranulose (97). Muitos autores

consideram a atipia coilocitótica como padrão-ouro para sugestão de infecção viral pelo HPV. Ao correlacionar as alterações citopáticas com a presença do DNA do HPV observou-se que apenas a hiperqueratose ($p=0,003$), a acantose irregular ($p=0,003$), e a papilomatose ($p=0,037$) permaneceram significativamente associadas a infecção; a atipia coilocitótica apresentou associação próxima a significância ($p=0,099$). Já a lesão exofítica, parakeratose, hiperplasia e perda da polaridade basal, segundo o PapilloCheck®, perderam a associação com a presença do vírus. Esta perda de associação pode ser consequência da migração de amostras negativas para lesão citopática com resultado NSHPV para outras categorias. Devido à maior sensibilidade do teste molecular o DNA do HPV foi detectado em algumas lesões NSHPV e negativas para alterações citopáticas, mudando estas amostras de categoria e provocando a perda da associação. Isto pode ter ocorrido devido à presença do vírus na forma de infecção subclínica ou assintomática, nestas lesões. Na verdade, a maioria dos homens infectados pelo HPV na infecção subclínica são assintomáticos (98). Além disso, é provável que genótipos de HPV não contemplados pelo PapilloCheck® estejam presentes nestas amostras, o que afeta diretamente as análises. Contudo, na continuação deste trabalho, o aumento do número de amostra, e assim diminuição do viés introduzido pela pequena amostragem revelará quais associações são realmente importantes.

Os resultados descritos acima corroboram parcialmente com dados da literatura. (97), demonstrou em 188 biópsias positivas tanto para histologia quanto para o DNA do HPV (hibridizaçãso in situ) a associação com seguintes alterações citopáticas: lesão exofítica ($p=0,18$), hiperqueratose ($p=0,21$), parakeratose ($p\leq 0,001$), acantose irregular ($p\leq 0,001$), papilomatose ($p\leq 0,001$), atipia coilocitótica ($p\leq 0,001$), hiperplasia e perda da polaridade basal ($p\leq 0,001$) e hipergranulose ($p=0,003$). Apenas os genótipos 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 42 foram pesquisados.

Assim, em relação a positividade, os achados deste trabalho reproduzem os dados da literatura, revela que informações importantes e que corroboram com estudos anteriores puderam ser retiradas do banco de dados de um laboratório clínico. Esta corroboração válida e assegura a credibilidade dos novos achados desta pesquisa que serão discutidos posteriormente. No geral, os resultados indicam que positividade para o HPV em homens e mulheres é alta, caracterizando um problema de saúde pública.

5.2 TIPO DE INFECÇÃO

No estudo como um todo, as infecções simples foram encontradas em 47,2% e as múltiplas em 52,8% das amostras. As infecções simples foram mais prevalentes nas mulheres que nos homens (56,4 *versus* 45%). Na verdade, o tipo de infecção também foi bastante diversificada nos grupos avaliados, variando de 35,9% nos homens com menos de 30 anos à 75% nas mulheres com lesões de alto grau. No geral, mulheres apresentam mais infecções simples que os homens, e homens e mulheres mais velhos tem mais infecções simples que homens e mulheres mais novos (**Figura 39**). Na figura 39, esta representada a proporção de infecção simples em todos os grupos avaliados neste estudo, entretanto, deve-se fazer o raciocínio contrário em relação a proporção apresentada para análise das infecções múltiplas. Mesmo apresentando a proporção de infecções simples é interessante destacar as múltiplas. Pois, estas parecem estar associadas a um maior risco oncogênico devido a sinergia entre os tipos de vírus. No entanto, a importância das infecções múltiplas ainda não esta completamente elucidada (99). As técnicas moleculares mais recentes tem maior capacidade de detecta-las do que as técnicas utilizadas do passado (RFLP), pois diferentes tipos de vírus são avaliados simultaneamente (100).

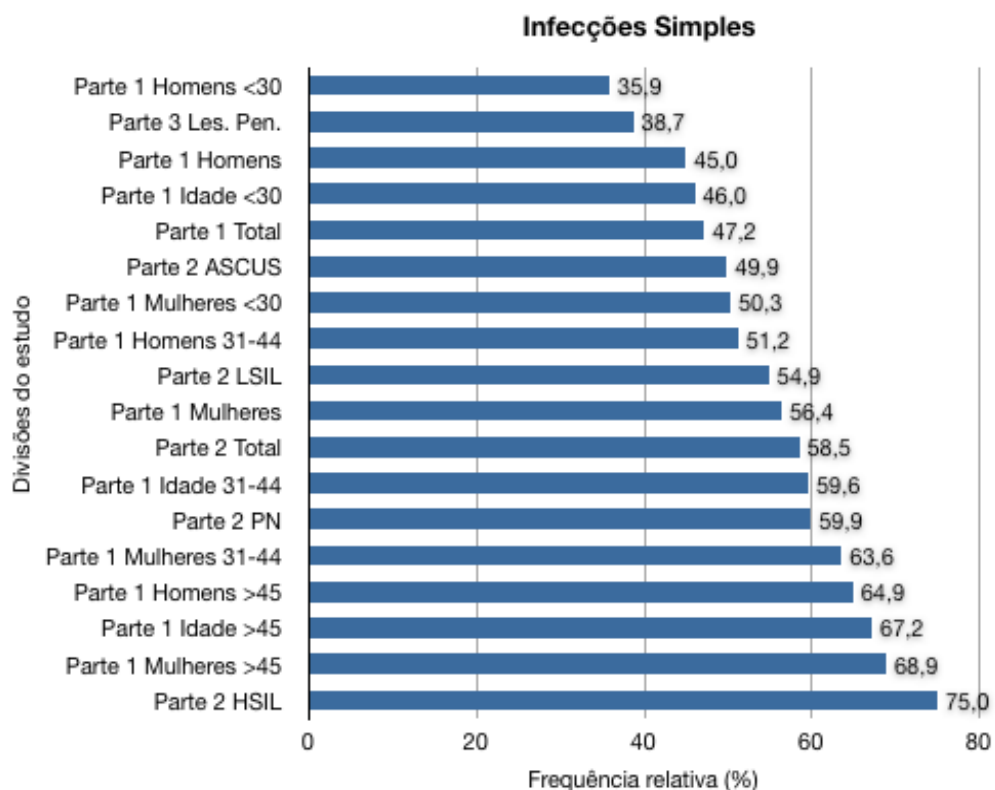


Figura 39 - Distribuição da proporção de infecção simples nos diferentes grupos incluídos nas partes 1, 2 e 3 deste estudo.

Poucos estudos compararam a proporção de infecções múltiplas e simples em homens e mulheres simultaneamente. De fato, as infecções múltiplas parecem atingir altas proporções tanto nos homens quanto nas mulheres. Um estudo com militares saudáveis revelou que 51,1% dos homens com HPV tinham infecções múltiplas (101). Além disso, o estudo prospectivo multinacional (HPV in men - HIM), que incluiu homens saudáveis entre 18-70 anos dos Estados Unidos, do Brasil e do México demonstrou que as infecções múltiplas ocorreram em 50,9% deles (102). Nas mulheres, um estudo recente revelou que a prevalência de infecções múltiplas é de 49,8% (26), e no Brasil as mulheres soropositivas para o HIV apresentam alta taxa deste tipo de infecção (78,9%) (103). Ademais, Piana e colaboradores revelaram que na Itália a proporções de infecções múltiplas nas mulheres atinge 49,1%, respectivamente (10).

Na parte dois do trabalho, quem incluiu apenas mulheres maioria com citologia normal, as infecções simples prevaleceram (58,5%) sobre as múltiplas (41,5%), e apresentaram proporções variáveis sem tendências de aumento ou diminuição nos diferentes grau de lesão celular 59,93%, 49,43%, 54,90%, e 75% para PN, ASCUS, LSIL e HSIL, respectivamente. Recentemente, Delgado e colaboradores revelaram que no país Basco, Espanha, as infeções múltiplas representam 58,1% dos resultados as mulheres com citologia anormal (96). Com relação as infecções múltiplas, Guan e colaboradores descreveram em sua meta análise que incluiu 423 estudos, envolvendo 115,789 mulheres positivas para o DNA do HPV, que estas variaram de 31-41% em PN, ASCUS, LSIL e HSIL (104).

Na parte três deste trabalho, que incluiu apenas homens com lesões genitais, as infecções simples representaram 38,7% dos resultados (61,3% para infecções múltiplas), reproduzindo os achados da primeira parte, que indica que as infecções múltiplas tem maior prevalência nos homens.

Recentemente, o estudo prospectivo multinacional (HPV in men - HIM), demonstrou que a positividade para homens com verrugas genitais foi de 80,4%, as infecções múltiplas foram encontradas em 45,5% dos resultados, e os genótipos de baixo risco contabilizaram 43,0% dos genótipos encontrados (85). Neste caso, a

percentagem para genótipos de baixo risco foi recalculado a partir da publicação para incluir os mesmos genótipos de baixo risco pesquisados pelo PapilloCheck®, pois a metodologia de genotipagem utilizada no HIM (Linear Array HPV Genotyping Test - Roche Diagnostics) que detecta 14 genótipos a mais que o PapilloCheck®, mas não inclui o genótipo de baixo risco 43. Assim, nos homens com lesões genitais, grupo mais similar ao do estudo supracitado, encontramos positividade semelhante, maior proporção de infecções múltiplas, e de genótipos baixo risco. Não podemos excluir que estas diferenças seja decorrentes das técnicas de genotipagem utilizada ou do tipo de estudo, prospectivo versus retrospectivo por análise de banco de dados.

Talvez um dos principais achados da parte três deste trabalho seja que, ao correlacionar as alterações citopáticas da histologia com o tipo de infecção, a paraceratose ($p=0,046$), atipia coilocitótica ($p<0,001$) e hiperplasia e perda da polaridade basal ($p=0,024$) estavam significativamente mais frequentes nas infecções múltiplas que na simples, sugerindo que estas alterações sejam características de infecções múltiplas. Lembrando que nenhuma destas alterações foram significativamente associadas à presença do DNA do HPV de associação com a positividade. Entretanto, esta análise foi realizada considerando apenas os resultados positivos e não deve ser comparada com a análise envolvendo resultados positivos e negativos. E revela que dentro das amostras positivas para o DNA do HPV, a proporção de algumas lesões se distribui igualmente nos dois tipos de infecção. A proporção de outras se distribui de forma desigual, sendo mais frequentes nas amostras com mais de um tipo de vírus. Este é o primeiro estudo que correlaciona alterações citopáticas com a presença de mais de um subtipo do vírus.

Assim, concluímos que as novas técnicas de genotipagem permitem detectar as infecções múltiplas com maior facilidade e estas representam uma percentagem alta das infecções tanto nas mulheres quanto nos homens. Além disso, os homens tendem a apresentar mais infecções múltiplas que as mulheres. Estudos específicos são necessários para conclusão definitiva sobre a importância das infecções múltiplas.

5.3 ONCOGENICIDADE VIRAL

A frequência dos genótipos de alto risco também foi bastante diversificada nos grupos estudados, variando de 42,6% nos homens lesão peniana à 85% nas mulheres com lesões de alto grau. No geral, mulheres apresentam mais genótipos de alto risco que os homens; homens e mulheres mais velhas, tem menos genótipos de alto risco que mulheres mais novas. Ademais, as maiores proporções de genótipos de alto risco foram observadas para mulheres mais jovens e com lesões citológicas (Figura 40).

Na parte 1 do estudo, as mulheres apresentam mais genótipos de alto risco que os homens (77,02% *versus* 57,9%, $P < 0,0001$). Ou seja, nos homens prevalecem os genótipos de baixo risco. Este resultado pode ser secundário a maior proporção de genótipos de alto risco detectado pelo PapilloCheck®, que inicialmente foi desenvolvido para mulheres (83); devido aos sítio anatômico testado em cada gênero; e tropismos diferenciado do vírus pelos diferentes epitélios (22). Pois, normalmente as mulheres testam a cérvix e os homens genitália externa (61). Normalmente, os genótipos de baixo risco são mais prevalentes na genitália externa masculina (105).

Ademais, nas mulheres que realizam citologia cervical e genotipagem para HPV (parte 2), os genótipos de alto risco representaram 73,7% dos 1311 tipos de HPV encontrados e tenderam a aumentar com o grau de lesão celular, 71,94%, 79,67%, 79,38%, e 85% para PN, ASCUS, LSIL e HSIL, respectivamente [$P(\text{trend})=0,0087$].

Na parte três do trabalho, os genótipos de alto risco representaram 42,6% dos resultados, ou sejam existe uma maior prevalência de genótipos de alto risco nas lesões penianas. Ademais, quando se comparou as alterações celulares com os genótipos de baixo ou alto risco, nenhuma associação significativa com oncogenicidade do vírus foi evidenciada. De fato, nas verrugas genitais os genótipos mais prevalentes são os de baixo risco, principalmente os genótipos 6 e 11, sendo encontrados em até 90% dos casos (106). Novamente, a maior prevalência de genótipos de baixo risco pode ser secundária ao tropismo celular dos diferentes tipos de vírus para epitélio queratinizado da pele do pênis, em comparação com o epitélio mucoso da cérvix vaginal, onde as infecções pelos HPV de alto risco são mais prevalentes (22). Assim, o fato de algumas alterações citopáticas estarem

significativamente associadas às infecções múltiplas, independentemente da oncogenicidade do vírus, sugere que a quantidade de genótipos tem maior influência sobre alterações celulares nas lesões penianas que o risco associado ao vírus.

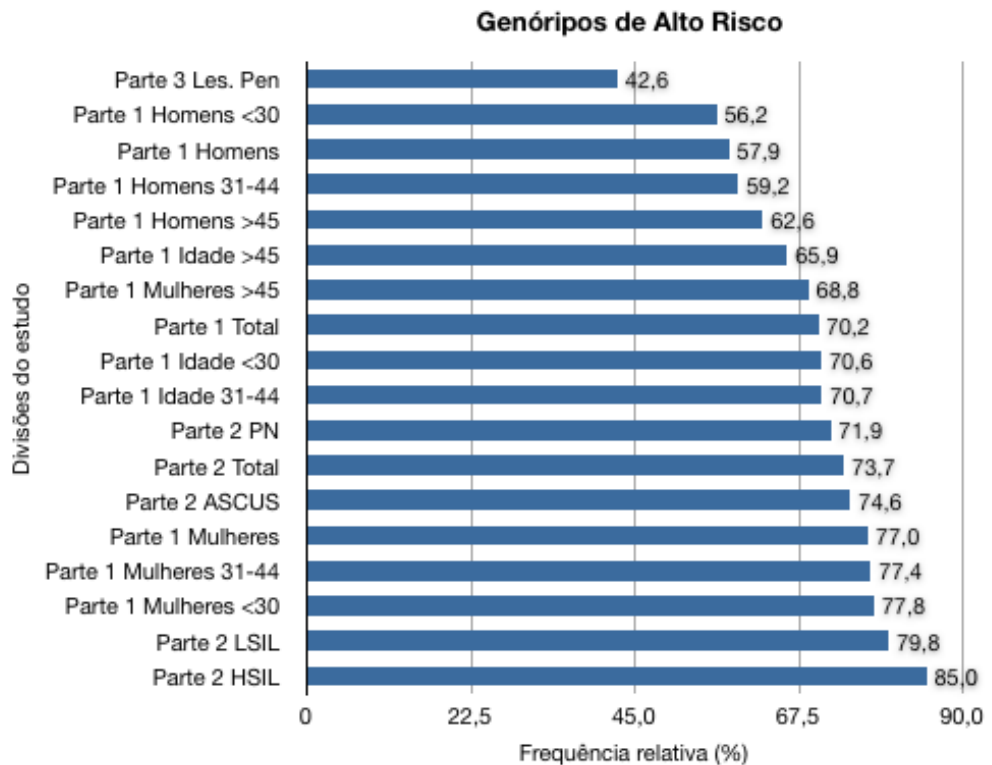


Figura 40 - Distribuição da proporção de genótipos de alto risco nos diferentes grupos incluídos nas partes 1, 2 e 3 deste estudo.

5.4 DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA DO HPV

A distribuição dos genótipos de HPV varia conforme o grupo estudado. Entretanto, alguns padrões podem ser observados. O genótipo 16 é o mais frequente em todos grupos, exceto nos homens (Figura 41).

	Genótipo HPV							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Parte 1 Total	16	56	6	44	42	53	66	68
Parte 1 Mulheres	16	56	53	44	66	6	42	68
Parte 2 PN	16	56	44	53	6	39	42	68
Parte 2 Total	16	56	53	44	6	39	66	68
Parte 2 ASCUS	16	52	56	31	53	39	73	51
Parte 2 HSIL	16	58	73	52	56	39	68	82
Parte 2 LSIL	16	56	66	68	53	31	51	39
Parte 1 Homens	6	42	44	16	56	11	53	66
Parte 3 Les. Pen.	6	11	42	39	44	31	51	56

Figura 41 - Distribuição dos genótipos de HPV nos diferentes grupos incluídos nas partes 1, 2 e 3 deste estudo.

Os oito genótipos mais prevalentes nas 4251 amostras incluídas neste estudo foram 16, 56, 6, 44, 42, 53, 66, e 68, sendo 3 de baixo risco (6, 42, e 44). Nas mulheres, os oito mais frequentes foram 16, 56, 53, 44, 66, 6, 42, e 68, novamente 3 genótipos de baixo risco. Como a maioria das amostras eram do sexo feminino 75,2%, os genótipos mais prevalentes nas mulheres são os mesmo da distribuição total. Por outro lado, nos homens os oito genótipos mais prevalentes foram 6, 42, 44, 16, 56, 11, 53 e 66, sendo 4 de baixo risco, condizendo com a maior proporção de genótipos de baixo risco nos homens relatada anteriormente. O estudo HIM, que incluiu amostras de homens brasileiros, obteve a seguinte distribuição genotípica para o HPV em ordem decrescente 84, 62, 52, 6, 16, cp6108 e 66 (102). Divergindo assim, parcialmente, da distribuição encontrada em nosso trabalho, sendo que em comum foram 16, 6, e 66. É interessante ressaltar que o genótipo 18 foi raro em nossa amostras, e dos considerados mais oncogênicos (16, 18, 45, 31, 33, 52, 35, e 58) (7), apenas o 16 estava presente entre os oito mais prevalentes.

Na parte dois do estudo, observou-se que os oito genótipos mais frequentes nesta parte do estudo foi 16, 56, 53, 44, 6, 39, 66, e 68, sendo dois genótipos de baixo risco (6 e 44), distribuição parecida com a observada para as amostras femininas da parte 1 deste trabalho, exceto pela presença do genótipo 39 e ausência do 42. Nas amostras com padrão normal a distribuição encontrada em ordem decrescente foi 16, 56, 44, 53, 6, 39, 42, e 68, mesmos genótipos encontrados na totalidade das amostras nesta parte 2. Nas amostras com citologia cervical ASCUS a distribuição se modificou 16, 52, 56, 31, 53, 39, 73, e 51, não foram observados genótipos de baixo risco, os HPV 52, 31, 73 e 51 se tornaram mais prevalentes. Já os genótipos 44, 6, 66 e 68 perderam representatividade. Nas citologias LSIL os genótipos 16, 56, 66, 68, 53, 31, 51, e 39, foram os mais prevalentes, novamente a distribuição se modificou e nenhum genótipo de baixo risco esta presente. Voltaram os genótipos 66 e 68. Por outro lado, o HPV 73 e 52 perderam representatividade. Finalmente, nas citologias HSIL os oito genótipos mais prevalente foram 16, 58, 73, 52, 56, 39, 68, e 82, todos de alto risco, sendo estes os genótipos mais oncogênicos deste estudo. Os genótipos 58 e 82, até então ausentes nos demais graus de lesão celular, ganharam representatividade, e juntamente com o HPV 73 e 52, substituíram o 31, 51, 66, e 53. Assim, observa-se que a distribuição genotípica é variável nos diferentes grupos avaliados (PN, ASCUS, LSIL e HSIL). Entretanto, praticamente os mesmos genótipos de HPV ocorrem entre os oito mais frequentes independentemente do grau de lesão celular. É importante ressaltar que o HPV 16 e o HPV 56 sempre ocorreram com alta representatividade, e os genótipos de baixo risco estavam presente apenas em PN. Quando avaliada estatisticamente, os genótipos 16, 6 e 44 foram os únicos a apresentarem tendência significativa de aumento ou diminuição com a piora na gravidade das lesões celulares, sendo que o HPV16 aumenta sua frequência com o aumento da gravidade da lesão celular [P(trend)=0,0029]. Enquanto, que o HPV6 [P(trend)=0,03] e o 44 [P(trend)=0,02] diminuem. O genótipo 16 normalmente é o mais prevalente, como descrito em uma série de outros estudos, independentemente do tipo e amostras pesquisados (96, 107, 108). Os genótipos 18 e 45 foram detectados com baixa frequência em nosso estudo, o genótipo 18 estava presente em 2,1% do total das amostras, sua frequência foi 2,3% nas mulheres e 1,7% nos homens, interessante sua frequência aumentou com o grau de lesão celular [PN (2,1%), ASCUS (3,3%), LSIL (4,1%) e HSIL (0%)]. Entretanto, por não ter sido detectado nas lesões de alto grau,

esta tendência não foi significativa. O mesmo foi observado na Espanha (96), e em outros países do sul da Europa (109). Por outro lado, na parte 3 do nosso estudo, observamos que nas lesões penianas a frequência do genótipo 18 foi maior que a do 16 (2,9% versus 1,5%), lembrando que o 16 foi sempre o mais frequente nas demais situações.

A distribuição genotípica do HPV em mulheres com citologia anormal no país Basco, Espanha é 16, 51, 53, 42, 52, 39, 18, 58 e 66. A positividade para o HPV era 69,8%, e das infecções multiplas 58,1%. Ademais, tanto a positividade [ASCUS (61,4%), LSIL (80%) e HSIL (77,8%)] quanto os genótipos de alto risco tendiam a aumentar com o grau de lesão celular [ASCUS (94,3%), LSIL (77,8%) e HSIL (99,9%)], a prevalência do HPV era maior nas mulheres mais jovens. O sistema de classificação citológica utilizado também foi de Bethesda 2001 e a método de genotipagem foi o Linear Array HPV Genotyping Test - Roche Diagnostics, entretanto foram incluídas apenas citologias anormais (ASCUS, LSIL, e HSIL). O DNA do HPV não foi detectado em 25% das amostras HSIL (96), divergindo de nossos resultados, onde foi observada a presença do HPV em 100% do resultados HSIL.

Um estudo retrospectivo transversal em todo o mundo, envolvendo 38 países na Europa, América do Norte, América do Sul e Central, África, Ásia e Oceânia, avaliou a distribuição genotípica do HPV no câncer cervical invasivo (110). 22.661 blocos de parafina foram obtidos a partir de 14.249 mulheres. 10.575 casos de câncer cervical invasivo foram incluídos no estudo, e 8977 (85%) destes eram positivos para DNA do HPV. Os tipos de HPV mais comuns foram 16, 18, 45, 31, 33, 52, 35, e 58 com uma contribuição relativa à escala mundial de 91%. Na Europa (16, 18, 33, 35, 45, 31, 35, 52, e 56), América do Norte (16, 18, 45, 31, 33, 52, 39, e 51), América do Sul e Central (16, 18, 45, 31, 52, 33, 72, e 39), África (16, 18, 45, 35, 52, 51, 31, e 33), Ásia (16, 18, 45, 58, 52, 31, 33, e 35) e Oceânia (16, 18, 45, 68, 33, 35, 39, e 53). Assim, no câncer cervical invasivo os genótipos de alto risco são mais prevalentes. Entretanto, os mesmos genótipos são responsáveis pela maioria dos casos, com destaque especial para o HPV16 e o HPV18 (110). O genótipo 18 teve pouca representatividade em nossas amostras, sendo que os genótipos mais oncogênicos deste estudo foram 16, 58, 73, 52, 56, 39, 68, e 82 (encontrados nos HSIL). Anteriormente, o mesmo grupo descreveu em uma meta análise envolvendo 78 estudos distribuição genotípica do HPV em mulheres com amostras citologia

cervical normal na África, Américas, Europa, e Ásia. Os tipos de HPV mais comuns foram 16, 18, 31, 58, e 52 com uma contribuição relativa de 50%. Na América do Sul os genótipos mais prevalentes foram 16, 58, 18, 45, e 31. O genótipo 16 foi o mais frequente em todas as regiões exceto no Japão e Taiwan onde o 52 foi o mais frequente (109). A distribuição nos resultados PN deste estudo foi 16, 56, 44, 53, 6, 39, 42, e 68.

Na meta-análise de Guan e colaboradores já cita anteriormente, somente os genótipos de alto risco 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, e 68 foram considerados. O HPV 16 variou pouco entre PN (20,4%), ASCUS (22,9%), e LSIL (25,1%), mas aumentou substancialmente em HSIL (47,5%), isto foi observado para todas as regiões geográficas do estudo (África, Ásia, Europa, América do Norte, América do Sul e Central e Oceânia). Sendo que na América do Sul os valores observados foram Normal (16,1%), Baixo grau (25,1%), e Alto grau (52,8%). Observamos resultados semelhantes em nosso estudo, PN (9,3%), ASCUS (13,7%), LSIL (11,3%), e HSIL (35%), entretanto as frequências relativas para o HPV em nossas amostras foram menores. Na meta-análise de Guan a positividade para os HPV 18 (8,4%, 9%, 8,7% e 9,6%) e 45 (4,8%, 5,8%, 4,3% e 4,5%) foram mais baixas e permaneceram relativamente constantes em PN, ASCUS, LSIL e HSIL, respectivamente. A positividade para os HPV 33, 58, 31, 52, e 35 também permaneceu relativamente constantes, mas a frequência observada em HSIL foi maior que em PN, e dos HPV 39, 59, 51, 56, e 68 apresentaram discreta variação, mas frequência observada em HSIL foi menor que em PN.

Com relação a distribuição genotípica do HPV, na parte três do estudo, observou-se que os oito genótipos mais prevalentes foram 6, 11, 42, 39, 44, 31, 51, e 53, sendo 4 de baixo risco. Os genótipos 6 e 11 foram os mais prevalentes. Resultado divergente da distribuição genotípica encontrada no estudo HIM onde os genótipos mais prevalentes foram 62, 84, 16, ep6108, 51, 6, 53, e 59 (85). Mas, parcialmente corrobora com a distribuição dos genótipos em verrugas genitais na França 6, 11, 16, 51, 52, 66, 53 e 31. Sendo que os HPV 6 e 11 estavam presentes em 83% das verrugas genitais (105). Ademais, na República Tcheca um estudo realizado em homens e mulheres observou que os oito genótipos mais prevalentes foram 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58 e 73 nos condilomas acuminados (30). Entretanto, a distribuição genotípica do HPV em homens na Eslovênia, onde foram analisadas em 55 verrugas genitais, observaram-se a presença do DNA do vírus em todas as

amostras com 14 genótipos diferentes de HPV. Os genótipos 6 e 11 foram os mais incidentes (96,4%), seguido pelos tipos 44, 91, 16, 31, 51, 53, 55, 62, 66, 70, 73 e 84 ((111). Cavalcanti et. Al. (2001) em 75 amostras histológicas, apenas 59 tinham a presença do vírus pelo método de hibridização. Os genótipos mais prevalentes nessa análise foram 6 e 11 (59,3%) (112). Na região anogenital detectou-se a partir de lesões clínicas a incidência relevante de infecção por tipos virais benignos (6 com 66,7% e 11 com 23,3%) (113). Nossos resultados estão compatíveis com os dados encontrados na literatura, onde se observa uma maior prevalência dos genótipos de baixo risco, principalmente, 6 e 11 nas lesões genitais masculina (114).

5.5 ESPÉCIES DE HPV

A distribuição das espécies de HPV varia conforme o grupo estudado. Entretanto, alguns padrões podem ser observados. A espécie mais frequente nas mulheres jovens de meia idade e com lesões citológicas é a A9 (alto risco). Nos homens, independentemente da idade, e nas mulheres mais velhas a espécie mais frequente é a A10 (baixo risco) (**Figura 42**). Na totalidade das amostras as espécies A9 (16, 31, 33, 35, 52, 58, e 67) foi a mais prevalente nas mulheres e a A10 (6, 11, e 44) nos, homem refletindo a distribuição genotípica dos genótipos de alto e baixo risco anteriormente citada.

Na parte 2 do estudo, em relação as espécies, a A9 (16, 31, 33, 35, 52, 58, e 67) é a mais prevalente em todos os grupos, exceto em LSIL onde é a segunda mais prevalente ficando atrás da A6 (53, 56, 66). Ademais, com o aumento da gravidade da lesão, espécie A9 aumenta sua frequência, 25,9%, 36,3%, 23,7%, e 50,0% para PN, ASCUS, LSIL e HSIL, respectivamente [P(trend)=0,04]. E a espécie A10 diminui sua frequência; 16,21%, 8,79%, 8,25%, e 5,00% para PN, ASCUS, LSIL e HSIL, respectivamente [P(trend)=0,0013]. Observação decorrente do aumento do HPV16 e diminuição dos HPV 6 e 44, ambas significativas na análise anterior.

Além disso, na parte 3 do trabalho as espécies mais prevalente foram A10, A7, e A9.

	Espécie HPV							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Parte 1 Total	A9	A6	A7	A10	A5	A1	A8	A11
Parte 1 Mulheres	A9	A6	A7	A10	A5	A1	A8	A11
Parte 2 PN	A9	A6	A7	A10	A5	A1	A8	A11
Parte 1 Idade <30	A9	A6	A7	A10	A5	A1	A8	A11
Parte 1 Idade 31-44	A9	A6	A7	A10	A5	A8	A1	A11
Parte 1 Mulheres <30	A9	A6	A7	A10	A5	A1	A8	A11
Parte 1 Mulheres 31-44	A9	A6	A7	A10	A5	A1	A8	A11
Parte 2 Total	A9	A6	A7	A10	A5	A8	A1	A11
Parte 2 ASCUS	A9	A7	A6	A10	A5	A8	A11	A1
Parte 2 HSIL	A9	A7	A6	A11	A5	A8	A10	A1
Parte 2 LSIL	A6	A9	A7	A10	A8	A5	A1	A11
Parte 1 Idade >45	A10	A9	A7	A6	A5	A1	A8	A11
Parte 1 Mulheres >45	A10	A9	A7	A6	A5	A1	A11	A8
Parte 1 Homens	A10	A6	A9	A7	A1	A8	A5	A11
Parte 1 Homens <30	A10	A6	A9	A7	A1	A8	A5	A11
Parte 1 Homens 31-44	A10	A6	A7	A9	A8	A1	A5	A11
Parte 1 Homens >45	A10	A7	A6	A9	A5	A1	A8	A11
Parte 3 Les. Pen.	A10	A7	A9	A1	A6	A5	A8	A11

Figura 42 - Distribuição das espécies de HPV nos diferentes grupos incluídos nas partes 1, 2 e 3 deste estudo.

5.6 INFLUÊNCIA DA IDADE SOBRE OS PARÂMETROS DA INFECÇÃO PELO HPV

Ao dividir as amostras do estudo em três faixas etárias, menor ou igual a 30, entre 31-44, e maior ou igual a 45, pode-se observar a influência da idade sobre o padrão de infecção pelo HPV. Para facilitar comparações, as faixas escolhidas foram as mesmas de estudo prévios (85, 102). Encontramos que a positividade foi maior

nos homens do que nas mulheres nas três faixas etárias ($P < 0,0001$), condizendo com a maior positividade dos homens no total das amostras. Entretanto, encontrou-se também que a positividade diminuía com o aumento da idade tanto nos homens quanto nas mulheres [$p(\text{trend}) < 0,0001$]. Assim, a idade influencia a positividade para o HPV, os mais jovens estão mais infectados e, independentemente da idade, os homens tem mais HPV que as mulheres. Resultado divergente de um estudo prévio que observou que a positividade para não varia com a idade nos homens (102). Por outro lado, a incidência de verrugas genitais nos homens, normalmente causadas pelo HPV, diminui significativamente com a idade, 3,43 em 1000 casos para 18-30 anos, 1,37 em 1000 casos para 31-44, e 1,27 em 1000 casos para 45-70 anos (85). Um revisão sistemática recente, analisou a prevalência do HPV de acordo com a idade em homens, revelou que a prevalência do HPV parece atingir o pico em idades um pouco mais velhas e permanece constante ou diminui ligeiramente com o aumento da idade, sugerindo infecção persistente pelo HPV ou uma maior taxa de reinfecção. Concordando, assim, parcialmente com nosso resultado (115). Por outro lado, os mesmo autores em 2008 avaliaram a prevalência do HPV de acordo com a idade em mulheres, observaram, de forma consistente, na maioria das regiões geográficas avaliadas o pico de prevalência ocorria na mulheres com idade ≤ 25 anos, e diminuía nos grupos etários mais velhos, concordando assim, com este estudo. Embora as curvas etárias de infecção pelo HPV diferissem notavelmente entre as regiões (mais de 70 países foram avaliados). O autor sugere que isto pode ser reflexo do comportamento sexual da população (116). No México, a positividade para o HPV em mulheres com citologia normal é de 14,5% (117). O DNA do HPV foi detectado em 16,7% das mulheres com idade inferior a 25 anos, com prevalência declinando rapidamente para 3,7% entre 35 e 44 anos. Detecção de HPV voltou a aumentar no grupo de mulheres com idade entre 45 e 54 anos (12,3%), e continuou a aumentar até um máximo de 23% entre as mulheres com 65 anos ou mais velhos (117), divergindo de nossos resultados.

Ainda em relação a idade, esta influenciou de forma significativa o tipo de infecção, pois observou-se que as infecções simples aumentam e as múltiplas diminuem com a idade [$p(\text{trend}) < 0,0001$]. E quando comparados homens e mulheres de cada faixa etária, as mulheres jovens (menor ou igual a 30 anos) e de meia-idade (entre 31-44) apresentaram proporção maior infecções simples que os homens da mesma idade. No entanto, isto não foi observado para os mais velhos (maior ou

igual a 45 anos). Lembrando que deve-se fazer o raciocínio contrário para as infecções múltiplas. O mesmo foi observado em relação os genótipos de alto e baixo risco, os genótipos de alto risco estavam significativamente mais frequentes nas mulheres jovens e de meia-idade em relação aos homens da mesma faixa etária, mas isto também não foi observado para os mais velhos. Ademais, a idade não influenciou significativamente a proporção de genótipos de alto e baixo risco, reproduzindo dados disponíveis na literatura para homens (102). Assim, as mulheres mais jovens e de meia-idade tem mais genótipos de alto risco e infecções múltiplas que os homens, as mulheres e homens mais velhos tem proporções semelhantes destes parâmetros, que não tendem a aumentar nem a diminuir com o avanço da idade.

A idade influenciou significativamente a frequência de alguns genótipos na totalidade das amostras, o HPV31 e HPV39 diminuem sua frequência com a idade, e os HPV44 e HPV45 aumentam. Como nenhum genótipo sofreu influencia da idade nos homens, e sim nas mulheres (HPV31 $P(\text{trend})=0,04$, HPV 39 $P(\text{trend})=0,0002$, e HPV 42 $P(\text{trend})=0,04$ diminuem, e HPV 44 $P(\text{trend})<0,0001$ e HPV 45 $P(\text{trend})=0,01$ aumentam), elas são as responsáveis por este resultado. Com relação influencia da idade sobre as espécies de HPV, observou-se que a espécie A10, composta pelos HPV 6, 11 e 44, tende a aumentar com a idade nas mulheres. Sendo, isto reflexo do resultado observado para o HPV 44 cuja frequência aumentou com maior significância.

Quando avaliada a influência da idade sobre os parâmetros da infecção pelo HPV nos diferentes graus de lesões celulares observou-se que a positividade para o HPV aumenta com grau de lesão celular e diminui com a idade nas três faixas etárias avaliadas menor ou igual a 30, entre 31-44, e maior ou igual a 45 (PN - $P(\text{trend})<0,0001$]; ASCUS - $P(\text{trend})=0,03$; LSIL - $P(\text{trend})=0,03$]; HSIL - $P(\text{trend})<0,0001$]. Além disso, a proporção de infecção simples aumenta com a idade [$P(\text{trend})<0,0001$], o mesmo ocorre para PN, ASCUS, LSIL, e HSIL, entretanto significância estatística foi obtida para PN [$P(\text{trend})<0,0011$], e LSIL [$P(\text{trend})=0,0014$], mas não para ASCUS [$P(\text{trend})=0,1$] e HSIL [$P(\text{trend})<0,5$]. Assim, tanto a idade quanto o grau de lesão celular influenciam, aparentemente de forma independente, a proporção de infecção pelo HPV nas mulheres incluídas nesta parte do estudo. As infecções simples também aumentam com a idade, reproduzindo o resultado encontrado na parte 1 do estudo. Sendo que as amostra

com citologia PN e LSIL foram as responsáveis por esta observação, principalmente, as amostras PN devido a sua maior representatividade.

Com relação aos genótipos de alto risco, estes diminuem com a idade na totalidade das amostras [$P(\text{trend})=0,016$], e nas citologias com Padrão normal [$P(\text{trend})=0,0097$]. Em ASCUS, LSIL e HSIL a proporção de genótipos de alto risco tende a aumentar, entretanto, sem significância estatística. Não ocorreram pacientes com HSIL e idade maior ou igual a 45 anos. Divergentemente, um estudo revelou que infecção por genótipos oncogênicos tende a aumentar com o grau de lesão 50%, 80%, e 85% para ASCUS, LSIL e HSIL, respectivamente (118).

Quando avaliou-se a influência da idade sobre a distribuição genotípica, observamos diferentes distribuições de acordo com a idade e com o grau de lesão celular. No geral, o tipo 16 é o mais prevalente ou se encontra entre os mais prevalentes independentemente da idade e do grau de lesão celular. O genótipo 56 também possui representatividade importante estando presente em 9 dos 10 grupos possíveis (exceto ASCUS ≥ 45 anos). Ademais, não existe uma sequência específica de genótipos mais prevalentes, pois a distribuição das frequências é bastante variável.

6 CONCLUSÕES

Por fim, este trabalho demonstra que muito conhecimento está escondido no banco de dados de laboratórios clínicos e a mineração de dados, como a realizada neste trabalho, pode ser uma ferramenta importante para que este conhecimento seja revelado. Entretanto, precisa ser confirmado aumentando o número de amostras analisadas inserindo outras metodologias. Assim, ao avaliar o banco de dados de resultados um laboratório clínico pode contribuir para o desenvolvimento médico e científico.

6.1 PARTE 1

A positividade geral para HPV neste estudo é de 44,3%. Os homens apresentaram proporção de resultados positivos maior que as mulheres (56,8% versus 44,3%, $p < 0,0001$). As infecções simples representam 47,2% dos resultados e são mais frequentes nas mulheres que nos homens (56,4% versus 45%, $p < 0,0001$).

No entanto, as mulheres têm mais genótipos de alto risco que os homens (77,02% versus 57,9%, $p < 0,0001$).

A distribuição genotípica encontrada em ordem decrescente foram: 16, 56, 6, 44, 42, 53, 66, e 68 no total das amostras; 16, 56, 53, 44, 66, 6, 42, e 68 nas mulheres; e 6, 42, 44, 16, 56, 11, 53, e 66 no homens.

A distribuição das espécies encontradas em ordem decrescente foram: A9, A6, A7, A10, A5, A1, A8, e A11 no total das amostras; A9, A6, A7, A10, A5, A1, A8, e A11 nas mulheres; e A10, A6, A9, A1, A8, A5, e A11 no homens.

A positividade foi maior nos homens do que nas mulheres em todas as faixas etárias avaliadas, ≤ 30 anos, entre 31-44 anos, e ≥ 45 anos ($p < 0,0001$); positividade diminuía com o aumento da idade em ambos os sexos [$P(\text{trend}) < 0,0001$]; As infecções simples aumentam com a idade [$P(\text{trend}) < 0,0001$]; As mulheres mais jovens e de meia-idade possuem mais infecções simples e genótipos de alto risco que os homens, ≤ 30 anos ($p < 0,0001$), 31-44 anos ($P = 0,00029$), e ≥ 45 anos ($p = 0,62$).

Nas mulheres, frequência dos genótipos 31 [$P(\text{trend}) = 0,04$], 39 [$P(\text{trend}) = 0,0002$] e 42 [$P(\text{trend}) = 0,04$] diminuem com a idade, e dos genótipos 44 [$P(\text{trend}) < 0,0001$], 45 [$P(\text{trend}) = 0,01$] aumentavam, o mesmo é observado para a espécie A10, mas não para as outras espécies; Nos homens a frequência genotípica não varia com a idade.

6.2 PARTE 2

A positividade para HPV nas mulheres que fizeram PapilloCheck® e colpocitologia é de 38,37%, e aumenta com a gravidade da lesão citológica, 34,05%, 66,41%, 92,73%, e 100% para PN, ASCUS, LSIL e HSIL, respectivamente [$P(\text{trend}) < 0,0001$]; As infecções simples representam 58,5% dos resultados, e é variável nos diferentes graus de lesão celular 59,93%, 49,43%, 54,90%, e 75% para PN, ASCUS, LSIL e HSIL, respectivamente. [$P(\text{trend}) = 0,51$]. Os genótipos de alto risco representam 73,7% dos tipos de HPV encontrados, e aumentam com o grau de lesão celular, 71,94%, 79,67%, 79,38%, e 85% para PN, ASCUS, LSIL e HSIL, respectivamente [$P(\text{trend}) = 0,0087$].

A distribuição decrescente dos tipos de HPV na totalidade das amostras foi 16, 56, 53, 44, 6, 39, 66, 68; padrão normal 16, 56, 44, 53, 6, 39, 42, 68; ASCUS 16,

52, 56, 31, 53, 39, 73, 51; LSIL 16, 56, 66, 68, 53, 31, 51, 39; HSIL 16, 58, 73, 52, 56, 39, 68, 82; sendo, assim, variável nos diferentes grupos avaliados. O HPV16 aumenta sua frequência com o aumento da gravidade da lesão celular [P(trend)=0,0029]. Os HPV6 [P(trend)=0,03] e o 44 [P(trend)=0,02] diminuem.

A espécie A9 é a mais prevalente em todos os grupos, exceto em LSIL. E com o aumento da gravidade da lesão, sua frequência aumenta, 25,9%, 36,3%, 23,7%, e 50,00% para PN, ASCUS, LSIL e HSIL, respectivamente [P(trend)=0,04]. A espécie A10 diminui sua frequência; 16,21%, 8,79%, 8,25%, e 5,00% para PN, ASCUS, LSIL e HSIL, respectivamente [P(trend)=0,0013].

A positividade para o HPV aumenta com grau de lesão celular e diminui com a idade, a proporção de infecção simples aumenta com a idade [P(trend)<0,0001], Já os genótipos de alto risco diminuem com a idade apenas na totalidade das amostras e nas com Padrão normal na citologia.

É o tipo 16 e 56 são os mais prevalente ou se encontram entre os mais prevalentes independentemente da idade e do grau de lesão celular.

6.3 PARTE 3

A positividade para o HPV nos homens que fizeram PapilloCheck® e biópsia de lesão peniana foi de 72,1%, as infecções simples representam 38,7% dos resultados, e os genótipos de alto risco 42,6% dos 63 tipos de HPV encontrados.

A distribuição decrescente dos tipos de HPV neste foi 6, 11, 42, 39, 44, 31, 51, e 53, e das espécies A10, A7, A9, A1, A6, A5, A8, e A11.

O HPV se associou significativamente com algumas alterações citopáticas: hiperqueratose (p=0,003), acantose irregular (p=0,003), e papilomatose (p=0,037); a atipia colicitótica apresentou associação próxima a significância (p=0,099). Paraceratose (p=0,046), atipia colicitótica (p<0,001) e hiperplasia e perda da polaridade basal (p=0,024) estavam associadas a infecção múltiplas. Não foi observado associação entre as alterações citopáticas com risco genótipo específico.

7 ANEXOS

7.1 RESUMOS ENVIADOS PARA CONGRESSOS EM 2011 E 2012 COM RESULTADOS DESTE TRABALHO.

(Destacamos, o item 6.1.5 HPV genotype/species distribution in both simple and multiple infections among men and women premiado como um dos melhores resumos enviados no congresso da American Association for clinical Chemistry em 2011).

7.2 DISTRIBUTION OF GENOTYPES/SPECIES OF HPV IN PENILE LESIONS BIOPSIES

Gustavo Barcelos Barra¹, Ticiane Henriques Santa Rita², Maria Cecilia Sant' Anna Soares Borges Caixeta¹, Camilla Figueiredo Chianca², Wanessa Lordêlo Pedreira Vivas², Patrícia de Oliveira Santos Almeida², Lara Franciele Ribeiro Velasco¹, Lidia Freira Abdlla¹, Sandra Santana Soares Costa¹.

Laboratório Sabin de Análises Clínicas¹, Brasília-DF
Universidade Tiradentes², Aracaju-SE

Introduction

Investigations on the human papillomavirus (HPV) are mostly focused on women. However, HPV infection in men and its consequences are not completely understood. The limited studies available suggest that the virus prevalence in men is high, and that they are the spreader of the infection. Thus, the aim of this study was to describe the HPV infection in penile lesions by comparing the results of biopsies with viral genotyping.

Methods

Through retrospective analysis of our laboratory results database, we assessed patients who had undergone biopsies and HPV genotyping in penile injury on the same day, between February 2009 and May 2011. Forty-three samples met this condition. Next, we evaluated the prevalence of HPV genotypes/species, and concordance between the two methodologies. In addition, we correlated the different cytological abnormalities evidenced by biopsy (exophytic lesion, hyperkeratosis, parakeratosis, irregular acanthosis, papillomatosis, hypergranulosis, coilocytotic atypia, keratinization and hyperplasia and loss of basal polarity) with the presence of the virus, the type of infection (simple and multiple) and its oncogenicity (high and low risk). The average age of patients was 30.3 ± 7.9 years, and genotyping was performed by PapilloCheck (Greiner Bio-One), which evaluates 24 different HPV types (18 high risk and 6 low risk).

Results

Genotyping demonstrated that 72.1% of penile lesions were positive for HPV. Among these, 38.7% were single infections and 61.3% multiple infections. Of 68 found viruses, 57.3% were low risk, 42.6% high risk, and the five most prevalent genotypes were 6 (25%), 11 (13.2%), 42 (10.3%), 39 (5.9%) and 44/55 (5.9%). When we

grouped the genotypes in species, A10 was the most prevalent (44.1%), consisting of low-risk genotypes, followed by A7 (14.7%) consisting of high-risk genotypes. However the biopsy demonstrated that 65.1% of the penile lesions showed cellular changes suggestive of viral infection. Thus, the agreement among the two methods was 69.6% ($P = 0.078$). The cellular changes associated with HPV were hyperkeratosis ($P = 0.003$), irregular acanthosis ($P = 0.003$) and papillomatosis ($P = 0.037$). The Koilocitotic atypia was close to significance ($P = 0.09$). In addition, we observed that parakeratosis ($P = 0.046$), koilocitotic atypia ($P < 0.0001$), hyperplasia ($P = 0.024$) and loss of basal polarity ($P = 0.024$) are more prevalent in multiple infections than in simple. However, we found no association between virus oncogenicity and cytological alterations.

Conclusion

In penile lesions for HPV positivity is high, multiple infections surpass the simple, and the genotypes/species of low risk are the most prevalent. The correlation between biopsy and genotyping is not complete, suggesting the presence of HPV types not covered by the genotyping test run, and the presence of the virus in the form of subclinical lesions. On the other hand, the association among the multiple infections and some types of cellular changes indicate the need for the presence of more than one type of viruses for its appearance in men. Thus, it is noted that important information about HPV infection in men could be extracted by analyzing a database of a clinical laboratory.

7.3 CHANGES IN HPV INFECTION PATTERN WITH ADVANCING OF AGE IN MEN AND WOMEN

Maria Cecilia Sant Anna Soares Borges Caixeta
 Monica Lino do Nascimento Vautier Franco
 Lara Franciele Ribeiro Velasco
 Patricia Godoy Garcia Costa
 Ticiane Henriques Santa Rita
 Lídia Freitas Abdalla
 Sandra Santana Soares Costa
 Virginia Minghelli Schmitt
 Gustavo Barcelos Barra

Laboratório Sabin de Análises Clínicas¹, Brasília-DF
 Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul² - PUCRS

Introduction

Human papillomavirus (HPV) is the most common sexually transmitted infection. Since age influences the sexual behavior, it can also affect the HPV infection patterns in men and women. In a previous study, we observed that positivity, multiple infections, and low-risk HPV genotypes and species are more prevalent in men than in women. Now, the aim of this work was to describe the influence of age on these aspects by assessing our clinical laboratory results database.

Methods

Through retrospective analysis of our HPV genotyping database, we assessed the sample results between February 2009 and May 2011. 4,251 samples were included,

all from HPV genotyping test of anogenital region. The genotype and species prevalences, single or multiple infection, high and low oncogenic risk were identified and presented by age groups ≤ 30 years, 31-44 years, ≥ 45 years, and gender. Overall, 1,991, 1,693, 567 samples were included in each age groups, respectively. Of these, 1,507, 1,299, and 395 were women, and 484, 394, and 172 were men. HPV genotyping was performed using PapilloCheck (Greiner Bio-One), which evaluates 24 different HPV genotypes (18 high-risk and 6 low risk).

Results

The database analysis demonstrates that men had proportionately more positive results than women in all age groups, 63.8% vs 49.1% ($p < 0.0001$) for ≤ 30 years, 54.1% vs 33.9% ($p < 0.0001$) for 31-44 years, and 43% vs 26.8% ($p < 0.0001$) for ≥ 45 years. In addition, the positivity declines with age in both genders ($P_{trend} < 0.0001$). Moreover, multiple infections are more frequent in young men, 64.1% vs 47.9% ($p < 0.0001$), and middle-aged men, 48.8% vs 36.4% ($p = 0.0029$) than women in the same age group. However, this difference was not found between older men and women, 35.1% vs 31.1% ($p = 0.62$). Also, multiple infections decline and simple infections increase with age in both genders ($P_{trend} < 0.0001$). Besides that, in women, the occurrence of some genotypes vary with age group, HPV31 - 5.15%, 4.02%, and 1.88% ($P_{trend} = 0.04$), HPV39 - 5.94%, 2.91%, and 1.25% ($P_{trend} = 0.0002$), HPV42 - 5.87%, 4.16%, and 3.13% ($P_{trend} = 0.04$), HPV44 - 4.36%, 7.48%, and 14.38% ($P_{trend} < 0.0001$), HPV45 - 1.29%, 2.63%, and 3.13% ($P_{trend} = 0.01$). This was not observed in men. Moreover, the proportion of high and low risk genotypes and HPV species distribution did not vary in and with age.

Conclusion

In this study, we observed that some patterns of HPV infection vary significantly in the assessed age groups. The positivity and multiple infections decrease, and single infections increase with advancing age in men and women. Also, the frequency of HPV31, HPV39, HPV42 decrease, and HPV44, HPV45 increase with age only in women. Moreover, younger and middle-aged men have more multiple infections than younger and middle-aged women, but this was not observed for the elders. The proportion of high and low risk genotypes and species did not vary among age groups. Thus, we conclude that some HPV infection patterns are influenced by age in men and women.

7.4 HPV INFECTION PATTERN AND GENOTYPE DISTRIBUTION IN CERVICAL CYTOLOGY AND IN PENILE LESION BIOPSIES

Gustavo Barcelos Barra¹,
 Ticiane Henriques Santa Rita²,
 Maria Cecilia Sant' Anna Soares Borges Caixeta¹,
 Camilla Figueiredo Chianca²,
 Wanessa Lordêlo Pedreira Vivas²,
 Patrícia de Oliveira Santos Almeida²,
 Lara Franciele Ribeiro Velasco¹,
 Lidia Freira Abdlla¹,
 Sandra Santana Soares Costa¹.

Laboratório Sabin de Análises Clínicas¹, Brasília-DF
Universidade Tiradentes², Aracaju-SE

Background

Investigations on the human HPV are mostly focused on women. However, HPV infection in men and its consequences are not completely understood. The aim of this study was to describe the HPV infection pattern and genotypes distribution in cervical cytology and in penile lesions biopsies by assessing our clinical laboratory results database.

Methods

We assessed patients who had undergone cervical cytology/penile lesion biopsies and HPV genotyping on the same day, between February 2009 and May 2011. 1731 women and 43 men samples met this condition. Positivity, type of infection, oncogenicity, and genotypes were identified and presented. In addition, we correlated these parameters with different cytological abnormalities evidenced by cytology (Bethesda system), or by biopsy. Genotyping was performed by PapilloCheck (GreinerBio-One).

Results

Positivity were 38,37% and 72.1% for cervical cytology and penile lesions, respectively. Multiple infections account for 41,5% in cervical cytology, and 61.3% in penile lesions. Of 1311 found viruses in cervical cytology, 73,7% were high risk, and of 68 found viruses in penile lesion 42.6% were high risk. In cervical cytology, positivity ($P<0,0001$) and high risk genotypes ($P=0,0087$) increased with the degree of cell injury. Moreover, the seven most common genotypes in normal cervical cytology were 16/56/44/53/6/39/42, in ASC-US 16/52/56/31/53/39/73, in LSIL 16/56/66/68/53/31/51, in HSIL 16/58/73/52/56/39/68, and in penile biopsies, 6/11/42/59/44/31/51. Additionally, hyperkeratosis ($P=0.003$), irregular acanthosis ($P=0.003$), and papillomatosis ($P=0.037$) were associated with HPV in penile biopsies. Parakeratosis ($P=0.046$), koilocitotic atypia ($P<0.0001$), hyperplasia ($P=0.024$) and loss of basal polarity ($P=0.024$) were more prevalent in multiple infections than in simple.

Conclusion

There are differences in positivity, multiple infections, and high risk genotypes prevalence between cervical cytology and penile lesion. Also, proportion of positivity and high risk genotypes increase with degree of cell injury in cervical cytology. Some cellular/hystological changes are significantly associated with HPV and multiple infections in penile lesions.

7.5 HPV GENOTYPE DISTRIBUTION IN BOTH SIMPLE AND MULTIPLE INFECTIONS AND CHANGES INFECTION PATTERN WITH ADVANCING OF AGE IN MEN AND WOMEN

Gustavo Barcelos Barra
Maria Cecilia Sant Anna Soares Borges Caixeta
Monica Lino do Nascimento Vautier Franco
Lara Franciele Ribeiro Velasco

Patricia Godoy Garcia Costa
Lidia Freitas Abdalla
Sandra Santana Soares Costa
Virginia Minghelli Schmitt

Background

HPV is the most common sexually transmitted infection. Since age influences the sexual behavior, it can also affect the HPV infection patterns in men and women. Moreover, genotyping rather than mere detection of HPV has been recommended, because different HPV genotypes confer distinctively different risks for development of cervical disease. Thus, the aim of this study was to describe the prevalence of HPV genotypes in single and multiple infections in men and women. Also, to describe the influence of age on these aspects by assessing our clinical laboratory results database.

Methods

Through retrospective analysis of our HPV genotyping database, we assessed the sample results between February 2009 and May 2011. 4,251 samples were included, all from HPV genotyping test of anogenital region. The positivity, single or multiple infection, and genotype prevalence, were identified and presented in total and by age groups ≤ 30 years, 31-44 years, ≥ 45 years, and gender. HPV genotyping was performed using PapilloCheck (Greiner Bio-One), which evaluates 24 different HPV genotypes (18 high-risk and 6 low risk).

Results

Forty four percent of tested samples were positive, 52.6% were single and 47.5% multiple infections. In total, men had proportionately more positive results than women, 56.8%vs40.4% ($p > 0.0001$), and in all age groups, 63.8%vs49.1% ($p < 0.0001$) for ≤ 30 years, 54.1%vs33.9% ($p < 0.0001$) for 31-44 years, and 43%vs26.8% ($p < 0.0001$) for ≥ 45 years. In addition, the positivity declines with age in both genders ($P_{trend} < 0,0001$). Moreover, men had proportionately more multiple infections than women, 57%vs44% ($p = 0.0006$). It was also observed in the younger, 64.1%vs47.9% ($p < 0.0001$), and middle-aged, 48.8%vs36.4% ($p = 0.0029$), but not in elders, 35.1%vs31.1% ($p = 0.62$). Also, multiple infections decline with age in both genders ($P_{trend} < 0,0001$). In women, the eight most common genotypes were 16/56/68/44/58/6/42/52 in single, and 56/16/53/66/51/31/6/39 in multiple infections. In men, the eight most common genotypes were 6/56/44/53/68/11/66/39 in simple, and 6/16/42/44/56/11/51/40 in multiple infections.

Conclusion

There are differences in the positivity and prevalence of multiple infections between men and women. Also, positivity and prevalence decrease with advancing age in the

assessed age groups. In addition, there are a higher prevalence of high risk and low risk genotypes in the female and male results, respectively.

7.6 HPV GENOTYPE/SPECIES DISTRIBUTION IN BOTH SIMPLE AND MULTIPLE INFECTIONS AMONG MEN AND WOMEN (TRABALHO PREMIADO COMO UM DOS MELHORES RESUMOS ENVIADOS NO CONGRESSO DA AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY EM 2011).

Monica Lino do Nascimento Vautier Franco
Maria Cecilia Sant Anna Soares Borges Caixeta
Lara Franciele Ribeiro Velasco
Patricia Godoy Garcia Costa
Sandra Santana Soares Costa
Gustavo Barcelos Barra
Virginia Minghelli Schmitt

Background

HPV genotyping rather than mere detection of HPV has been recommended. Because different HPV genotypes confer distinctly different risks for development of cervical disease and persisting HPV infection is a critical step in cervical carcinogenesis. Moreover, genotyping enables the detection of multiple infections, which has been associated with an increased risk of developing cervical cancer. Furthermore, the prevalence of different genotypes varies geographically, and HPV infection in men is relatively less described and understood. Thus, the aim of this study was to describe the prevalence of HPV genotypes and species in single and multiple infections in men and women by assessing our clinical laboratory results database.

Methods

Through retrospective analysis of our HPV genotyping database, we assessed the samples results between February 2009 and September 2010. 2,134 samples were included all from HPV genotyping test of anogenital region. The genotype and species prevalences were identified and presented by gender and single or multiple infection. The patients age average was 33.0 ± 10.08 years, among women 32.8 ± 9.99 years, and among men 33.7 ± 10.29 . HPV genotyping was performed using PapilloCheck (Greiner Bio-One), which evaluates 24 different HPV genotypes (18 high-risk and 6 low risk).

Results

The database analysis demonstrates that 44% of tested samples were positive. Among these, 52.6% were single infections and 47.5% multiple infections. Men had proportionately more positive results 56.8% vs 40.4% ($p > 0.0001$) and also more multiple infections 57% vs 44% ($p = 0.0006$), than women. In women, the eight most common genotypes were 16, 56, 68, 44/55, 58, 6, 42, 52 in single infections, and 56, 16, 53, 66, 51, 31, 6, 39 in multiple infections. In men, the most eight most common genotypes were 6, 56, 44/55, 53, 68, 11, 66, 39 in simple infections, and 6, 16, 42, 44/55, 56, 11, 51, 40 in multiple infections. When we grouped the HPV genotypes in

species, the species A9 comprising the high-risk genotypes 16, 31, 33, 35, 52, 58, 67 was more prevalent in women and statistically different from the proportion found in men, both in single 31.8% vs 7.7% ($p < 0.0001$) and in multiple infections in 25.7% vs 19.3% ($p = 0.01$). On the other hand, the species A10 that comprise Low-risk genotypes 6, 11, 44 was the most prevalent among men and statistically different from the proportion found in women 31.7% vs 14.5% ($p < 0.0001$) both in single infections and 23.4% vs 10.9% ($p < 0.0001$) in multiple infections.

Conclusion

In this study, we observed that there is a high positivity in the HPV genotyping testing and multiple infections comprise a significant portion of these results. Moreover, there are differences in the positivity, in the prevalence of multiple infections, in the genotype distribution, of both the simple and the multiple infections, in the results between men and women. In addition, there are a higher prevalence of high risk and low risk genotypes/species in the female and male results, respectively. However, we cannot exclude that these differences are due different anatomical sites tested in men, and explained by differences in tissue tropism of specific types of HPV.

7.7 ARTIGOS CIENTÍFICOS PRODUZIDOS PELA ALUNA DURANTE O PERÍODO DE MESTRADO (EM PUBLICAÇÃO)

Amplification refractory mutation system qPCR for genotyping clinical relevant genomic variations: A concept modification resulting in objective data evaluation and exemption from endogenous controls

Gustavo Barcelos Barra, Patrícia Godoy Garcia Costa, Maria Cecília Sant'Anna Borges Caixeta, Cláudia Ferreira de Sousa, Lara Franciele Ribeiro Velasco.
Laboratório Sabin de Análises Clínicas Brasília, Distrito Federal, Brasil.

Clinical Chemistry MSID: CLINCHEM/2011/180984

Diagnóstico molecular - passado, presente, e futuro.

Molecular diagnosis - past, present and future

Gustavo Barcelos Barra, Maria Cecília Sant Anna Soares Borges Caixeta, Patrícia Godoy Garcia Costa, Claudia Ferreira de Sousa, Lara Franciele Ribeiro Velasco
Laboratório Sabin, Brasília-DF

RBAC vol 43 nº 03/2011

7.8 APROVAÇÕES EM COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF.CEP-1109/10

Porto Alegre, 08 de outubro de 2010.

Senhora Pesquisadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 10/05160 intitulado **"Estudo da prevalência dos genótipos de HPV em indivíduos do DF e validação de método para detecção dos oncogenes E6 e E7 dos genótipos mais frequentes nas lesões cervicais de alto grau"**.

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e final deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Rodolfo Herberto Schneider
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilma. Sra.
Profa. Virginia Minghelli Schmitt
FFARM
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6690 – 3º andar – CEP: 90610-000

Sala 314 – Fone Fax: (51) 3320-3345

E-mail: cep@pucrs.br

www.pucrs.br/prppg/cep

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Distribuição genotípica do papilomavírus humano (HPV) nas biópsias de lesão em homens

Pesquisador Responsável: Wanessa Lordêlo Pedreira Vivas

Data da Versão: 17/09/2011

Cadastro: 170911

Data do Parecer: 03/10/2011

Grupo e Área Temática: III - Projeto fora das áreas temáticas especiais

Objetivos do Projeto

Analisar a distribuição genotípica do papilomavírus humano (HPV) nas biópsias de lesões em homens.

Sumário do Projeto

O estudo consiste em um levantamento de dados dados no Laboratório Sabin de Análises Clínicas de Brasília, onde serão analisadas as solicitações médica para os exames de genotipagem para HPV e biópsia, para determinação de uma prevalência dos genótipos em conjunto com o tipo de lesão celular.

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Outro (citar no comentário)
Outras instituições envolvidas	Sim
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os itens de identificação

Introdução	Adequada
------------	----------

Comentários sobre a Introdução

Objetivos	Adequados
-----------	-----------

Comentários sobre os Objetivos

Pacientes e Métodos	
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total NA Local
Cálculo do tamanho da amostra	Não informado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Crterios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Adequada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Avaliação dos dados	Ausente
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Adequado
Adequação às Normas e Diretrizes	Não

Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos

Cronograma	Adequado
Data de início prevista	10/2011
Data de término prevista	12/2011
Orçamento	Ausente

Página 1-2

Universidade Tiradentes - UNIT

 Prof.ª Adriana Karla de Lima
 Comitê de Ética em Pesquisa
 Coordenadora

Fonte de financiamento externa	Não Informado
--------------------------------	---------------

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

Referências Bibliográficas	Adequadas
----------------------------	-----------

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

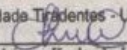
Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

Projeto apto a ser executado por possuir um planejamento metodológico adequado aos objetivos.

Página 2-2

Universidade Tiradentes - UNIT


Prof.ª Adriana Karla de Lima
Comitê de Ética em Pesquisa
Coordenadora

8 REFERÊNCIAS

1. Anic GM, Giuliano AR. Genital HPV infection and related lesions in men. *Preventive medicine*. 2011;53 Suppl 1:S36-41. Epub 2011/10/14.
2. Ciapponi A, Bardach A, Glujovsky D, Gibbons L, Picconi MA. Type-specific HPV prevalence in cervical cancer and high-grade lesions in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *PloS one*. 2011;6(10):e25493. Epub 2011/10/13.
3. Vaccarella S, Plummer M, Franceschi S, Gravitt P, Papenfuss M, Smith D, et al. Clustering of human papillomavirus (HPV) types in the male genital tract: the HPV in men (HIM) study. *The Journal of infectious diseases*. 2011;204(10):1500-4. Epub 2011/09/13.
4. Chen Z, Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Anastos K, Segondy M, et al. Evolution and taxonomic classification of human papillomavirus 16 (HPV16)-related variant genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. *PloS one*. 2011;6(5):e20183. Epub 2011/06/16.
5. Faridi R, Zahra A, Khan K, Idrees M. Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virology*. 2011;8:269. Epub 2011/06/04.
6. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004;324(1):17-27. Epub 2004/06/09.
7. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England journal of medicine*. 2003;348(6):518-27. Epub 2003/02/07.
8. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003;89(1):101-5. Epub 2003/07/03.
9. Conesa-Zamora P, Ortiz-Reina S, Moya-Biosca J, Domenech-Peris A, Orantes-Casado FJ, Perez-Guillermo M, et al. Genotype distribution of human papillomavirus (HPV) and co-infections in cervical cytologic specimens from two outpatient gynecological clinics in a region of southeast Spain. *BMC infectious diseases*. 2009;9:124. Epub 2009/08/12.
10. Piana A, Sotgiu G, Castiglia P, Pischedda S, Cocuzza C, Capobianco G, et al. Prevalence and type distribution of human papillomavirus infection in women from North Sardinia, Italy. *BMC Public Health*. 2011;11:785. Epub 2011/10/13.
11. Ursu RG, Onofriescu M, Nemescu D, Iancu LS. HPV prevalence and type distribution in women with or without cervical lesions in the Northeast region of Romania. *Virology*. 2011;8:558. Epub 2011/12/24.
12. INCA. Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil. In: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva CGdAE, Coordenação de Prevenção e Vigilância., editor. 2011.
13. Lippman SA, Sucupira MC, Jones HE, Luppi CG, Palefsky J, van de Wijgert JH, et al. Prevalence, distribution and correlates of endocervical human papillomavirus types in Brazilian women. *Int J STD AIDS*. 2010;21(2):105-9. Epub 2010/01/22.

14. Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 3:S3/42-51. Epub 2006/09/05.
15. de Almeida AM, Wolff AAS, Marques JA, Dias JCS, Cury LCPB, Rabelo MMS, et al. Condutas clínicas frente aos resultados do exame de Papanicolaou. In: FOSP FOdSP-, editor. 4 ed. ed2011.
16. Safaeian M, Solomon D, Castle PE. Cervical cancer prevention--cervical screening: science in evolution. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2007;34(4):739-60, ix. Epub 2007/12/07.
17. Snijders PJF. Os desafios de um processo de tomada de decisão. . HPV Today. 2011(Edição especial Holanda 2011).
18. Castle PE. The potential utility of HPV genotyping in screening and clinical management. *J Natl Compr Canc Netw*. 2008;6(1):83-95. Epub 2008/02/13.
19. INCA. Diretrizes Brasileiras para Rastreamento do Câncer do Colo do Útero. In: Saude INdCMd, editor. inca.gov.br2011.
20. Lawindy SM, Rodriguez AR, Horenblas S, Spiess PE. Current and future strategies in the diagnosis and management of penile cancer. *Adv Urol*. 2011;2011:593751. Epub 2011/06/21.
21. INCA. Câncer de pênis. 2012; Available from: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/penis>.
22. Giuliano AR, Palefsky JM, Goldstone S, Moreira ED, Jr., Penny ME, Aranda C, et al. Efficacy of quadrivalent HPV vaccine against HPV Infection and disease in males. *The New England journal of medicine*. 2011;364(5):401-11. Epub 2011/02/04.
23. Banura C, Mirembe FM, Katahoire AR, Namujju PB, Mbonye AK, Wabwire FM. Epidemiology of HPV genotypes in Uganda and the role of the current preventive vaccines: A systematic review. *Infect Agent Cancer*. 2011;6(1):11. Epub 2011/07/14.
24. Chaves JHB, Vieira TKB, Ramos JS, Bezerra AFS. Peniscopia no rastreamento das lesões induzidas pelo papilomavirus humano. *Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica*. 2011;9(1).
25. Palefsky JM. Human papillomavirus-related disease in men: not just a women's issue. *The Journal of adolescent health : official publication of the Society for Adolescent Medicine*. 2010;46(4 Suppl):S12-9. Epub 2010/03/30.
26. Otero-Motta AP, Ordonez JL, Gonzalez-Celador R, Rivas B, Macias Mdel C, Bullon A, et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes in cytologic abnormalities from unvaccinated women living in north-western Spain. *APMIS*. 2011;119(3):204-15. Epub 2011/02/03.
27. Widdice LE, Breland DJ, Jonte J, Farhat S, Ma Y, Leonard AC, et al. Human papillomavirus concordance in heterosexual couples. *The Journal of adolescent health : official publication of the Society for Adolescent Medicine*. 2010;47(2):151-9. Epub 2010/07/20.
28. Mariani L, Venuti A. HPV vaccine: an overview of immune response, clinical protection, and new approaches for the future. *J Transl Med*. 2010;8:105. Epub 2010/10/29.
29. IARC. A review of human carcinogens: biological agents IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; 2011. p. 1-502.

30. Tachezy R, Smahelova J, Salakova M, Arbyn M, Rob L, Skapa P, et al. Human papillomavirus genotype distribution in Czech women and men with diseases etiologically linked to HPV. *PLoS one*. 2011;6(7):e21913. Epub 2011/07/19.
31. Barra GB. Laboratório Sabin de Análises Clínicas - Estatísticas sobre exame de genotipagem de HPV. Comunicação pessoal 2012.
32. Grady D, Hearst N. Usando Base de Danos Existentes. In: artmed, editor. *Delineando a Pesquisa Clínica: uma abordagem epidemiológica*. 3 ed2008. p. 384.
33. Kataoka H, Sugiura T. [The ideal form of laboratory information management]. *Rinsho Byori*. 2005;53(1):39-46. Epub 2005/02/24.
34. Ferraro CTLC, N. H. S.; de Oliveira, S. P.; Carvalho, M. G. C; Dias, E. P. Infecção oral pelo HPV e lesões epiteliais proliferativas associadas. *Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial*. 2011;47(4):451-9.
35. IARC. Human papillomaviruses. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 2008/03/22 ed: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; 2007. p. 1-636.
36. zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1288(2):F55-78. Epub 1996/10/09.
37. Gutiérrez EICG, C. H. L. Papilomavirus Humano. *Biología Molecular y Patogénesis. Revista Salud Publica y Nutricion [Internet]*. 2001; 2(2). Available from: <http://www.respyn.uanl.mx/ii/2/ensayos/papiloma.html>.
38. Rivoire WA, Corleta HVE, Brum IS, Capp E. Biologia molecular do câncer cervical. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*. 2006;6(4).
39. Fauquet CMM, M. A. The 7th ICTV Report. *Archives of Virology*. 2001;146(1):189-94.
40. ICTV. Virus Taxonomy: 2009 Release. International Committee on Taxonomy of Viruses; 2010; Available from: <http://ictvonline.org/index.asp>.
41. Hoory T, Monie A, Gravitt P, Wu TC. Molecular epidemiology of human papillomavirus. *J Formos Med Assoc*. 2008;107(3):198-217. Epub 2008/04/11.
42. Os Papilomavírus Humanos – HPV: histórico, morfologia e ciclo biológico. [database on the Internet]. 2003. Available from: <http://www.publicacoesacademicas.uniceub.br/index.php/cienciasaude/article/view/502/323>.
43. Cerqueira DM. Prevalência, Freqüência de Genótipos e de Variantes de Papilomavírus Humanos em Mulheres Co-infectadas com o Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 no Distrito Federal e Entorno. . Repositório Institucional: Universidade de Brasília; 2007.
44. Alencar TR. Análise da variabilidade genética, filogenia e expressão gênica de HPV de alto risco no DF. . Repositório Institucional: Universidade de Brasília; 2009.
45. Dalstein V, Merlin S, Bali C, Saunier M, Dachez R, Ronsin C. Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus. *J Virol Methods*. 2009;156(1-2):77-83. Epub 2008/12/02.
46. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(5):342-50. Epub 2002/06/05.
47. Leto MGP, Porro AM, Junior dos Santos GF, Tomimori J. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. *Anais Brasileiro de Dermatologia*. 2011;86(2):306-17.
48. Vaucel E, Coste-Burel M, Laboisie C, Dahlab A, Lopes P. Human papillomavirus genotype distribution in cervical samples collected in routine clinical

- practice at the Nantes University Hospital, France. Arch Gynecol Obstet. 2011;284(4):989-98. Epub 2010/11/26.
49. Ye J, Cheng X, Chen X, Ye F, Lu W, Xie X. Prevalence and risk profile of cervical Human papillomavirus infection in Zhejiang Province, southeast China: a population-based study. Virol J. 2010;7:66. Epub 2010/03/24.
50. Oliveira-Silva M, Lordello CX, Zardo LM, Bonvicino CR, Moreira MA. Human Papillomavirus in Brazilian women with and without cervical lesions. Virol J. 2011;8:4. Epub 2011/01/07.
51. INCA. Colo do Útero. Instituto Nacional de Câncer2012; Available from: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio/definicao.
52. NCI. What You Need To Know About TM : Cancer of the Cervix. Nacional Cancer Institute2008; NIH Publication number 08-2407]. Available from: <http://cancer.gov/cancertopics/wyntk/cervix>.
53. WHO. World Health Organization. 2012; Available from: <http://www.who.int/en/>.
54. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins & Cotran: Patologia - Bases Patológicas das Doenças. 8 ed2010. 1480 p.
55. NCI. Cervical Cancer. National Cancer Institute at National Institute of Health2012; Available from: <http://cancer.gov/cancertopics/types/cervical>.
56. Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. Nat Rev Cancer. 2007;7(1):11-22. Epub 2006/12/23.
57. Koss LGG, C. Introdução à citopatologia ginecológica com correlações histológicas e clínicas.2006.
58. Wang SS, Zuna RE, Wentzensen N, Dunn ST, Sherman ME, Gold MA, et al. Human papillomavirus cofactors by disease progression and human papillomavirus types in the study to understand cervical cancer early endpoints and determinants. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 2009;18(1):113-20. Epub 2009/01/07.
59. Fonseca-Moutinho JA. Smoking and cervical cancer. ISRN Obstet Gynecol. 2011;2011:847684. Epub 2011/07/26.
60. Colon-Lopez V, Ortiz AP, Palefsky J. Burden of human papillomavirus infection and related comorbidities in men: implications for research, disease prevention and health promotion among Hispanic men. P R Health Sci J. 2010;29(3):232-40. Epub 2010/08/31.
61. Silva HA, Silveira LMS, França GS, Rego ACSS. A citopatologia uretral como ferramenta na detecção de efeito citopático do papilomavírus humano (HPV) em pacientes com peniscopia característica de infecção viral Revista brasileira de análises clínicas. 2008;40(1):69-71.
62. Giuliano AR, Anic G, Nyitray AG. Epidemiology and pathology of HPV disease in males. Gynecol Oncol. 2010;117(2 Suppl):S15-9. Epub 2010/02/09.
63. de Paula AAP, Netto JCA, da Cruz AD, Júnior Freitas R. Carcinoma epidermóide do pênis: considerações epidemiológicas, histopatológicas, influência viral e tratamento cirúrgico. Revista Brasileira de Cancerologia. 2005;51(3):243-52.
64. de Carvalho NS, Kannenberg AP, Munaretto C, Yoshioka D, Absy MCV, Ferreira MA, et al. Associação entre HPV e câncer peniano: revisão da literatura. DST - Jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis. 2007;19(2):92-5.

65. INCA. Nomenclatura Brasileira para Laudos Cervicais e Condutas Preconizadas: Recomendações para Profissionais de Saúde. *Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial*. 2006;42(5):351-73.
66. Aidé S, Almeida G, do Val I, Vespa Junior N, Campaner AB. Neoplasia Intraepitelial Cervical. *DST – Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*. 2009;21(4):166-70.
67. Novaes LCG. Diagnóstico de papilomatose humana por reação em cadeia de polimerase em casos de divergência entre resultados de captura híbrida e citologia oncológica. . *Biblioteca Digital de Teses e Dissertações: Universidade Católica de Brasília*; 2005.
68. Sankaranarayanan RW, R. S. A Practical Manual on Visual Screening for Cervical Neoplasia. In: Publication IT, editor. Lyon2003.
69. Muller GC, Maziero C. Alterações citológicas: uma revisão sobre a importância da citologia oncológica. *Unoesc&Ciência – ACBS*. 2010;1(2):87-94.
70. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica - Texto e Atlas*. 11 ed2008. 524 p.
71. ASCCP. ASCCP – American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. 2012; Available from: <http://www.asccp.org/>.
72. do Carmo BB. Estudo comparativo entre a Citologia convencional e a Citologia em meio líquido na detecção de lesões escamosas intraepiteliais e invasoras do colo uterino associadas à infecção pelo papilomavírus humano. . <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/>: Universidade Federal de Minas Gerais; 2004.
73. Castro AFC, S. *Ginecologia/Mulher: HPV-papilomavírus*. . 2003; Available from: <http://www.drashirleydecampos.com.br/noticias/7471>.
74. Caixeta MCSSB. Revisão dos testes laboratoriais moleculares para diagnóstico de HPV. [Monografia de conclusão de curso]. In press 2008.
75. do Carmo EFS, Fiorini S. Principais técnicas moleculares para detecção do papilomavírus humano. *Revista de Saúde e Biologia*. 2007;2(1):29-31.
76. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, et al. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2006;119(5):1095-101. Epub 2006/04/06.
77. Rijkaart DC, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Bulkman NW, Heideman DA, et al. Human papillomavirus testing for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer: final results of the POBASCAM randomised controlled trial. *The lancet oncology*. 2012;13(1):78-88. Epub 2011/12/20.
78. Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, et al. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial. *The lancet oncology*. 2010;11(3):249-57. Epub 2010/01/22.
79. Farah SB. *DNA Segredos e Mistérios*. 2 ed2007.
80. Guindalini CT, S. Uso de microarrays na busca de perfis de expressão gênica: aplicação no estudo de fenótipos complexos. *Revista brasileira de psiquiatria*. 2007;29(4):370-4.
81. Le Crom S, Marc P. DNA microarray principle. *Biology Department Genomic Service*2011 [cited 2012]; Available from: <http://transcriptome.ens.fr/sgdb/presentation/principle.php>.

82. Castle PE, Sadorra M, Garcia F, Holladay EB, Kornegay J. Pilot study of a commercialized human papillomavirus (HPV) genotyping assay: comparison of HPV risk group to cytology and histology. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(11):3915-7. Epub 2006/09/15.
83. Bio-One G. PapilloCheck®: Test Kit for the genotyping of 24 types of genital HPV- Manual. 2008.
84. Silva-Pereira I. Amplificação de DNA por PCR. In: Brasilia Ud, editor. *Técnicas Básicas em Biologia Molecular*2003. p. 99-110.
85. Anic GM, Lee JH, Stockwell H, Rollison DE, Wu Y, Papenfuss MR, et al. Incidence and human papillomavirus (HPV) type distribution of genital warts in a multinational cohort of men: the HPV in men study. *The Journal of infectious diseases*. 2011;204(12):1886-92. Epub 2011/10/21.
86. Jones J, Powell NG, Tristram A, Fiander AN, Hibbitts S. Comparison of the PapilloCheck DNA micro-array Human Papillomavirus detection assay with Hybrid Capture II and PCR-enzyme immunoassay using the GP5/6+ primer set. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2009;45(2):100-4. Epub 2009/04/28.
87. Software G. GraphPad Prism version 5.00 for Windows. San Diego California USA.
88. Antonisamy S, Solomon C, Prasanna S. Hypothesis Testing - Categorical Data. In: Hill TM, editor. *Biostatistics: principles and practice*2010. p. 116-25.
89. Bryant D, Rai N, Rowlands G, Hibbitts S, Jones J, Tristram A, et al. Human papillomavirus type distribution in vulval intraepithelial neoplasia determined using PapilloCheck DNA Microarray. *Journal of medical virology*. 2011;83(8):1358-61. Epub 2011/05/28.
90. Damay A, Fabre J, Costes V, Didelot JM, Didelot MN, Boule N, et al. Human papillomavirus (HPV) prevalence and type distribution, and HPV-associated cytological abnormalities in anal specimens from men infected with HIV who have sex with men. *Journal of medical virology*. 2010;82(4):592-6. Epub 2010/02/19.
91. Van Doornum GJ, Prins M, Juffermans LH, Hooykaas C, van den Hoek JA, Coutinho RA, et al. Regional distribution and incidence of human papillomavirus infections among heterosexual men and women with multiple sexual partners: a prospective study. *Genitourinary medicine*. 1994;70(4):240-6. Epub 1994/08/01.
92. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2005;32 Suppl 1:S16-24. Epub 2005/03/09.
93. Trottier H, Franco EL. Human papillomavirus and cervical cancer: burden of illness and basis for prevention. *The American journal of managed care*. 2006;12(17 Suppl):S462-72. Epub 2007/01/06.
94. Burchell AN, Winer RL, de Sanjose S, Franco EL. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 3:S3/52-61. Epub 2006/09/05.
95. Camara GN, Cerqueira DM, Oliveira AP, Silva EO, Carvalho LG, Martins CR. Prevalence of human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions in the Federal District of Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003;98(7):879-83. Epub 2004/02/06.
96. Delgado D, Marin JM, de Diego J, Guerra S, Gonzalez B, Barrios JL, et al. Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in women with abnormal cervical

cytology in the Basque Country, Spain. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*. 2011. Epub 2011/12/31.

97. Hippelainen MI, Syrjanen S, Hippelainen MJ, Saarikoski S, Syrjanen K. Diagnosis of genital human papillomavirus (HPV) lesions in the male: correlation of peniscopy, histology and in situ hybridisation. *Genitourinary medicine*. 1993;69(5):346-51. Epub 1993/10/01.

98. Hagensee ME, Cameron JE, Leigh JE, Clark RA. Human papillomavirus infection and disease in HIV-infected individuals. *The American journal of the medical sciences*. 2004;328(1):57-63. Epub 2004/07/16.

99. Chaturvedi AK, Myers L, Hammons AF, Clark RA, Dunlap K, Kissinger PJ, et al. Prevalence and clustering patterns of human papillomavirus genotypes in multiple infections. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2005;14(10):2439-45. Epub 2005/10/11.

100. Garbuglia AR, Piselli P, Lapa D, Sias C, Del Nonno F, Baiocchi A, et al. Frequency and multiplicity of human papillomavirus infection in HIV-1 positive women in Italy. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2012. Epub 2012/03/23.

101. Lajous M, Mueller N, Cruz-Valdez A, Aguilar LV, Franceschi S, Hernandez-Avila M, et al. Determinants of prevalence, acquisition, and persistence of human papillomavirus in healthy Mexican military men. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2005;14(7):1710-6. Epub 2005/07/21.

102. Giuliano AR, Lee JH, Fulp W, Villa LL, Lazcano E, Papenfuss MR, et al. Incidence and clearance of genital human papillomavirus infection in men (HIM): a cohort study. *Lancet*. 2011;377(9769):932-40. Epub 2011/03/04.

103. Levi JE, Kleter B, Quint WG, Fink MC, Canto CL, Matsubara R, et al. High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(9):3341-5. Epub 2002/08/31.

104. Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, de Sanjose S, Franceschi S, et al. Human papillomavirus (HPV) types in 115,789 HPV-positive women: A meta-analysis from cervical infection to cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2012. Epub 2012/02/11.

105. Aubin F, Pretet JL, Jacquard AC, Saunier M, Carcopino X, Jaroud F, et al. Human papillomavirus genotype distribution in external acuminata condylomata: a Large French National Study (EDiTH IV). *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008;47(5):610-5. Epub 2008/07/22.

106. Monsonego J. Genital infection with HPV in men: research into practice. *Lancet*. 2011;377(9769):881-3. Epub 2011/03/04.

107. de Ona M, Alvarez-Arguelles ME, Torrents M, Villa L, Rodriguez-Feijoo A, Palacio A, et al. Prevalence, evolution, and features of infection with human papillomavirus: a 15-year longitudinal study of routine screening of a women population in the north of Spain. *Journal of medical virology*. 2010;82(4):597-604. Epub 2010/02/19.

108. Martorell M, Garcia-Garcia JA, Ortiz C, Perez-Valles A, Calabuig C, Gomez-Cabrero D, et al. Prevalence and distribution of human papillomavirus findings in swab specimens from gynaecology clinics of the east coast of Spain. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 2010;42(6-7):549-53. Epub 2010/03/10.
109. de Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, Clifford G, Bruni L, Munoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *The Lancet infectious diseases*. 2007;7(7):453-9. Epub 2007/06/29.
110. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *The lancet oncology*. 2010;11(11):1048-56. Epub 2010/10/19.
111. Potocnik M, Kocjan BJ, Seme K, Poljak M. Distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes in genital warts from males in Slovenia. *Acta dermatovenerologica Alpina, Panonica, et Adriatica*. 2007;16(3):91-6, 8. Epub 2007/11/13.
112. Cavalcanti SMB, Carvalho MOO, E. S. Estudo da prevalência de papilomavírus humanos em lesões do trato genital masculino. *DST J Bras Doenças Sex Transm* 2001;13(2):27-31.
113. zur Hausen H, de Villiers EM. Human papillomaviruses. *Annual review of microbiology*. 1994;48:427-47. Epub 1994/01/01.
114. Svare EI, Kjaer SK, Worm AM, Osterlind A, Meijer CJ, van den Brule AJ. Risk factors for genital HPV DNA in men resemble those found in women: a study of male attendees at a Danish STD clinic. *Sexually transmitted infections*. 2002;78(3):215-8. Epub 2002/09/20.
115. Smith JS, Gilbert PA, Melendy A, Rana RK, Pimenta JM. Age-specific prevalence of human papillomavirus infection in males: a global review. *The Journal of adolescent health : official publication of the Society for Adolescent Medicine*. 2011;48(6):540-52. Epub 2011/05/18.
116. Smith JS, Melendy A, Rana RK, Pimenta JM. Age-specific prevalence of infection with human papillomavirus in females: a global review. *The Journal of adolescent health : official publication of the Society for Adolescent Medicine*. 2008;43(4 Suppl):S5-25, S e1-41. Epub 2008/10/01.
117. Lazcano-Ponce E, Herrero R, Munoz N, Cruz A, Shah KV, Alonso P, et al. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2001;91(3):412-20. Epub 2001/02/15.
118. Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005;97(14):1066-71. Epub 2005/07/21.